



Aus dem Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

des Fachbereichs Medizin der Philipps Universität Marburg

pH-abhängige strukturelle und funktionelle Variationen des β -Galactosid-bindenden Proteins Galectin-3

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tobias Maximilian von Mach

aus Mainz

Marburg, August 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 27.09.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Ralf Jacob

Korreferent: Prof. Dr. Uwe Maier

Teile dieser Arbeit haben zu folgenden Artikeln beigetragen:

von Mach T, Carlsson M, Straube T, Nilsson U, Leffler H, Jacob R: **Ligand binding and complex formation of Galectin-3 is modulated by pH variations**. In Revision (2013)

Straube T, von Mach T, Hönig E, Greb C, Schneider D, Jacob R: **pH-Dependent Recycling of Galectin-3 at the Apical Membrane of Epithelial Cells**. Traffic (2013)

Tagungsbeiträge (Auswahl):

Straube T, von Mach T, Greb C, Jacob R: **Micromembrane interactions of Galectin-3**.
2011 ASCB Annual Meeting. Denver, USA (Dezember 2011)

von Mach T, Straube T, Greb C, Jacob R: **Switch of membrane domains: galectin-3 can do both**. 2. Student-organized International Symposium of the DFG Research Training Group 1216 on "Intra- and Intercellular Transport and Communication". Marburg (September 2011)

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	5
2.1	Das Epithel	5
2.2	Epithelialer Transport von Proteinen	7
2.2.1	Rab-Proteine und subzelluläre Lokalisation	7
2.2.2	Apikaler Proteintransport	8
2.2.3	Basolaterale Sortiersignale	12
2.2.4	Endozytose	13
2.3	Galectine	14
2.3.1	Struktur und Zuckerspezifitäten von Galectin-3	15
2.3.2	Lipidinteraktion von Galectinen	18
2.3.3	Oligomerisierungseigenschaften von Galectinen	19
2.4	Lipide	19
2.4.1	Einteilung und Struktur	20
2.4.2	Lipidtrafficking und die Theorie der <i>lipid rafts</i>	21
2.4.3	Membranmodelle	22
2.4.3.1	<i>Giant plasma membrane vesicles</i> (GPMV)	23
2.5	pH-abhängige Prozesse in der Zelle	24
2.6	Zielsetzung der Arbeit	27
3.	Material und Methoden	28
3.1	Geräte, Chemikalien und Materialien	28
3.2	Lösungen und Puffer	33
3.3	Modellmembranen zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen	36
3.3.1	Synthetisierte Lipidmembranen	36
3.3.1.1	Synthese von <i>Large unilamellar vesicles</i> (LUV)	36
3.3.1.2	<i>Lipid monolayer assay</i> (LMA)	38
3.3.2	Aus Zellen-stammende Lipidmembranen	38
3.3.2.1	Isolation von <i>Giant plasma membrane vesicles</i> (GPMVs)	38
3.4	Aufreinigung	39
3.4.1	Proteinaufreinigung	39
3.4.2	Lipid-Extraktion	40

3.5	Spektroskopie / Chromatographie	40
3.5.1	Durchflusszytometrie	40
3.5.2	Fluoreszenzpolarisation (FP)	41
3.5.3	CD-Spektroskopie	42
3.5.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	42
3.5.5	Turbiditätsassay	43
3.5.6	Dünnschichtchromatographie (DC)	43
3.5.7	Größenausschlusschromatographie	44
3.5.8	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> -Polyacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.5.9	Native Gelelektrophorese	46
3.5.10	Proteinbestimmung nach Lowry	46
3.5.11	Proteinbestimmung mittels UV-Spektroskopie	46
3.6	Mikroskopietechniken	47
3.6.1	Elektronenmikroskopie	47
3.6.2	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie (KLSM)	47
3.6.3	<i>Ground state depletion</i> GSD-Mikroskopie	48
3.6.4	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force</i> Mikroskopie AFM)	50
3.7	Proteinmarkierung	50
3.7.1	Coomassie	50
3.7.2	Silberfärbung	50
3.7.3	Spezifische Proteinmarkierung	51
3.7.3.1	Alexa Fluor® 647	51
3.7.3.2	Snap-Tag®	51
3.8	Molekularbiologische Methoden	52
3.8.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	52
3.8.2	DNA-Restriktion	53
3.8.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	53
3.8.4	Ligation	54
3.8.5	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	54
3.8.6	Plasmidisolierung	54
3.8.7	Sequenzierung	55
3.8.8	Auflistung verwendeter und eigener konstruierter DNA-Vektoren	56
3.9	Zellkultur	57

3.9.1	Zelllinien	57
3.9.2	Zellkulturlösungen	58
3.9.3	Kultivierung	58
3.9.4	Zellpassage	59
3.9.5	Stabile Transfektion der MDCK II Zelllinie	59
3.9.6	Aufbewahrung und Auftauen von Zellen	60
3.9.7	Poly-L-Lysin Beschichtung	61
3.9.8	Verwendete Zelllinien	61
3.10	Biochemische Methoden	61
3.10.1	Western-Blot	61
3.10.2	Dot-Plot	62
3.10.3	Flotation	63
3.10.4	Lipidbandstreifen-Blot	64
3.10.5	MSD-Technologie	64
3.11	Datenerhebung und -auswertung	65
3.11.1	Fluoreszenzintensitätsanalysen	65
3.11.2	Statistik	66
4.	Ergebnisse	67
4.1	Biochemische Analysen von Galectin-3	67
4.1.1	Tertiär- und quartärstrukturelle Analysen von Galectin-3	67
4.1.1.1	Aufreinigung von Galectin-3 und dessen Mutanten	67
4.1.1.2	Spektroskopische Analyse der Tertiärstruktur von Galectin-3	68
4.1.1.3	Spektroskopische Analyse der Quartärstruktur von Galectin-3 als Oligomer in Lösung	70
4.1.2	Bindungskinetiken von Galectin-3 zu unterschiedlichen Glykanen	76
4.1.3	Verhalten von Galectin-3 in einem sauren Milieu	77
4.1.3.1	pH-abhängige Bindung von Galectin-3	77
4.1.3.2	pH-abhängige Oligomerisierung von Galectin-3	79
4.1.3.3	pH-abhängige Inhibition der Bindungskinetiken	80
4.2	Etablierung eines Vesikelmodells aus einer nativen Zellmembran	84
4.2.1	Grundlagen zur Isolierung von GPMVs aus MDCK II Zellen	84
4.2.2	Zusammensetzung von GPMVs aus MDCK II Zellen	85
4.2.3	Verwendung von GPMVs für mikroskopische Analysen	87
4.2.4	Verwendung von GPMVs im Durchflusszytometer	88

4.2.5	Phasenseparationen	89
4.3	Membraninteraktionen von Galectin-3	91
4.3.1	Bindungseigenseigenschaften zu GPMVs	91
4.3.2	Inter-spezifische Adhäsion zweier Membranen durch Galectin-3	94
4.3.3	Intra-spezifische Membrancluster von Galectin-3	95
4.3.3.1	Membrancluster mit unterschiedlichen Markern.....	96
4.3.3.2	Verteilung von p75-GFP in GPMVs nach Inkubation mit Galectin-3-WT ...	96
4.3.3.3	3D-Visualisierung der Clustereigenschaften von Galectin-3 in GPMVs	100
4.3.4	pH-abhängige Bindung von Galectin-3 an native Membranen	100
4.3.5	Selektive pH-abhängige Affinitäten von Galectin-3.....	102
4.3.5.1	Einfluss der Bindungsintensität von Galectin-3 durch Sulfatide an nativen Membranen von GPMVs	103
5.	Diskussion	105
5.1	GPMVs als natives Modellmembransystem	105
5.2	Lipidbindende Eigenschaften von Galectin-3	108
5.3	Oligomerisierung.....	110
5.4	pH-abhängige Interaktionen von Galectin-3	112
5.5	Zelluläres Recycling von Galectin-3	115
5.6	Ausblick	119
6.	Literaturverzeichnis	120
7.	Anhang.....	127
7.1	Abkürzungsverzeichnis	127
7.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	130
7.3	Danksagung.....	131
7.4	Kalkulierte Salzbrücken in der Bindungstasche von Galectin-3.....	134
7.5	Zuckerstrukturen.....	135
7.6	Daten, die in Kooperation oder durch Betreuung von Studenten entstanden sind.....	136

1. Zusammenfassung

Die Zelle besitzt einen komplexen Apparat, um den gerichteten Transport von Proteinen und Lipiden in einem Epithel zu steuern. Zur Aufrechterhaltung der Sortierung wurden Kontrolleure entwickelt, die einem Cargoprotein den richtigen Weg zuweisen. Einer dieser Kontrolleure ist das Protein Galectin-3, welches zur Gruppe der β -Galactosid-bindenden Proteine gehört und bevorzugt Lactose- bzw. N-Acetyllactosamin-enthaltende Glykoliganden bindet. Als ein wichtiges Sortiersignal wurden unterschiedliche Glykosylierungen identifiziert, die entscheidend für die apikale bzw. basolaterale Zuweisung sind. Es wird vermutet, dass nach Bindung eines Liganden Galectin-3 einen Komplex mit diesem eingeht und durch Assoziation mit gewissen Membranarealen eine Sortierung des Proteins einleitet, wobei ein direkter Beweis bisher noch nicht erbracht wurde.

In dieser Arbeit konnten sowohl die Bindung zu komplexen Glykoliganden als auch die Assoziation zu gewissen Membranarealen gezeigt werden, wobei diese Untersuchungen zum ersten Mal in einer nahezu nativen Membran in Form von *giant plasma membrane vesicles* (GPMVs) durchgeführt wurden. Diese Modellmembran stammte aus dem apikalen Teil von MDCK II Zellen und wurde für die Verwendung mit unterschiedlichen methodischen Fragestellungen etabliert. Die Vesikel zeigten eine Zell-ähnliche Lipid- und Proteinkomposition, wodurch physiologische Prozesse im Vergleich zu anderen Modellen gezielter analysiert werden konnten. So wurde mit den komplex-glykosylierten Liganden Asialofetuin und dem Neurotrophinrezeptor p75 die Wirkung von Galectin-3 spezifiziert, wobei die Sortierung von Proteinen in der Membran und die Bindungskapazitäten von Galectin-3 als Oligomer untersucht wurden. Galectin-3 kann als einziges Protein der Galectin-Familie hoch-molekulare Cluster mit seinen Liganden eingehen. Es konnte in *in vitro* Studien die Größe des Clusters mit einem freien Liganden und einen direkten Einfluss der Avidität auf die Interaktion zu komplexen Zuckern beschrieben werden. Die Oligomerisierung fand Liganden-induziert statt, wobei konzentrationsabhängig das Oligomer gezielt geformt oder wieder aufgelöst werden konnte.

Da Galectin-3 endosomale Kompartimente durchquert, wurde weiterhin der Einfluss einer azideren Umgebung bei der Interaktion des Proteins zu diversen Liganden analysiert. Es zeigte sich, dass komplexe Liganden die Bindung zu Galectin-3 bei erniedrigtem pH verloren, wohingegen die Bindung zu einfachen Zuckern wie Lactose bestehen blieb. Ebenfalls wurde

das Glykolipid Sulfatid als Bindungspartner identifiziert, das gezielt bei erniedrigtem pH an das Protein binden konnte. Diese Spezifitäten ergeben neue Einblicke in die Wirkung von Galectin-3, da sie den Wechsel zwischen Bindung von einem Cargoprotein an der Plasmamembran und Freisetzung in aziden endosomalen Kompartimenten beschreiben können.

Zusammengefasst öffnen die Ergebnisse dieser Arbeit neue Einblicke in die Wirkungsweise von Galectin-3-abhängigen Sortierprozessen in epithelialen Zellen.

1. Summary

The cell has a complex apparatus to control the directed transport of proteins and lipids in the epithelium. To maintain this order controllers have been developed which assign a cargo protein into the right direction. One of these controllers is galectin-3, which belongs to the group of β -galactoside-binding proteins and binds lactose or N-acetyllactosamine-containing glycoligands, preferably. As an important sorting signal different glycosylation sites have been identified that are critical for the apical or basolateral assignment. It is believed that after binding to a ligand galectin-3 forms a complex and associates within certain membrane areas to introduce sorting of the protein. A direct evidence for this process has not been provided yet.

In this work, the binding to complex glycoligands and the association with specific membrane domains could be detected. These measurements were performed in a native plasma membrane in the form of giant plasma membrane vesicles (GPMVs) for the first time. GPMVs as model membranes originated from the apical part of MDCK II cells and have been established for different methodological issues. The vesicles showed a cell-like lipid- and protein-composition, which could be used to analyze physiological processes close to the native cellular system. With this model the effect of galectin-3 on the complex-glycosylated ligands asialofetuin and neurotrophinrezeptor p75 was specified, wherein the sorting process of proteins in the membrane and the binding capacity of galectin-3 as an oligomer have been observed. As a unique feature in the galectin family galectin-3 can form high-molecular clusters with its ligands. In *in vitro* studies, the size of the cluster with a free ligand and the direct influence of the avidity to the interaction with complex sugars have been described. The oligomerization started in a ligand-initiated fashion and the oligomer can be formed or dissolved dependent on the concentration of the ligand.

Since galectin-3 traverses endosomal compartments, the influence of a more acidic environment in the interaction of the protein was analyzed for various sugar ligands. It was found that complex ligands lost the binding to galectin-3 at reduced pH generally, whereas binding to simple sugars such as lactose remained. Also the glycolipid sulfatide has been identified as a new potential interaction partner that could bind to the protein at reduced pH, solely. These specificities give new insights into the effect of galectin-3, as they can describe

the exchange between binding of a cargo protein at the plasma membrane and its release into acidic endosomal compartments.

In summary, this work opened new avenues in the mechanistic view of galectin-3-dependent sorting processes in epithelial cells.

2. Einleitung

2.1 Das Epithel

Das Epithel des Organismus dient primär als Schutzbarriere vor äußeren Einflüssen der Umwelt. Es ist dafür zuständig einen selektiven Austausch unterschiedlicher Stoffe zu ermöglichen. Dabei ist die Grundstruktur des Epithels abhängig von der Funktion, die es erfüllen soll. Die Haut besteht hierbei aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, wohingegen das Epithel der Nierentubuli isoprismatisch einschichtig ist.

Da für diese Arbeit das Nierenepithel von entscheidender Bedeutung war, soll dieses exemplarisch für Epithelien näher beschrieben werden. Die Epithelzellen des Nierentubulus sind Bestandteil des Nephrons, das eine funktionelle Untereinheit der Niere bildet. Im Nephron wird das Blut über die Glomeruli gefiltert, woraufhin das entstehende Filtrat (Primärharn) in die Nierentubuli gelangt. Diese bestehen aus einem proximalen und einem distalen Teil, woran sich das Sammelrohr anschließt, das den Harn in das Nierenbecken abführt. Das Epithel hat in diesem Teil der Niere die Aufgabe der Reabsorption und Sekretion unterschiedlicher Moleküle. So wird bspw. Glucose dem Primärharn über spezielle Transporter zu 100 % bei einem gesunden Menschen wieder entzogen (Wright 2001). Zur Etablierung dieser speziellen Transportvorgänge braucht das Nierenepithel eine Polarität, die einen gerichteten Transport von Molekülen aus dem Lumen über die Zelle ins Interstitium bewerkstelligt. Die Membran der Zellen sind daher aus einem apikalen und einem basolateralem Teil aufgebaut. Hierbei zeigt die apikale Membran Richtung Lumen und die basolaterale Membran zu benachbarten Zellen und zur Basallamina, die sich direkt an die Zelle anschließt und den Kontakt zu dem Interstitium herstellt (s. Abbildung 2-1). Beide Membranteile sind getrennt durch *tight junctions* (auch *Zonula occludens* genannt), die einen Austausch von Lipiden und Proteinen verhindern und damit die Polarität aufrechterhalten. Weitere Bestandteile der basolateralen Membran sind Desmosomen und Hemidesmosomen, die die Zell-Zell-Adhäsion verstärken und *gap junctions*, die für einen schnellen Austausch von Substanzen innerhalb der Epithelschicht sorgen.

Die apikale unterscheidet sich von der basolateralen Membran sowohl hinsichtlich der Protein- als auch der Lipidkompositionen, welche ständig, bedingt durch den polarisierten Vesikeltransport, aufrecht erhalten werden. Die apikale Membran zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Sphingolipiden und Cholesterol aus, wohingegen die basolaterale Komposition

durch Phosphatidylcholine bestimmt wird (Simons *et al.*, 1988). Ikonen und Simons postulierten, dass bedingt durch die Lipidkomposition in der apikalen Membran die Formierung von Lipidzusammenlagerungen gefördert werden könnte. Es entstand damit die Theorie der *lipid rafts* (s. 2.4.2), die die Sortierung von Proteinen induzieren sollen.

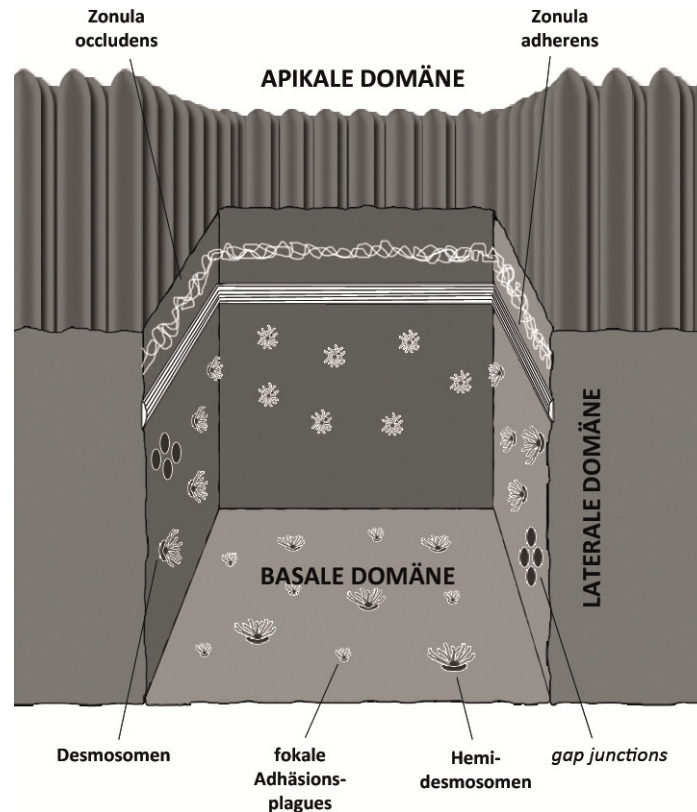


Abbildung 2-1 Grundstrukturen einer Epithelzelle

Modifiziert nach Dissertation von Dominik Schneider.

Auch ist der Aufbau der Mikrotubuli und Aktinzytoskelette in diesen Epithelzellen im Vergleich zu anderen Zellen verändert. So ist eng unterhalb der apikalen Membran ein Gürtel aus Aktinfasern gespannt, der die Festigkeit der Zelle erhöht. Ebenfalls gibt es neben dem klassischen Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule-organizing center* - MTOC), das auf Höhe des Zellkerns in die Peripherie der Zelle strahlt, wobei das Minus-Ende am Zentrosom liegt, eine zusätzliche Verteilung von Mikrotubuli. In Epithelzellen sind die Mikrotubuli entlang der apiko-basalen Achse zueinander orientiert. Hierbei zeigt das Minus-Ende zur apikalen und das Plus-Ende zur basalen Seite (Bacallao *et al.*, 1989).

2.2 Epithelialer Transport von Proteinen

2.2.1 Rab-Proteine und subzelluläre Lokalisation

Rab-Proteine gehören zur Ras Superfamilie, die als katalytische Untereinheit eine GTPase Aktivität besitzen. Sie sind in allen Eukaryoten zu finden und zeigen über Spezies hinweg eine hohe Sequenzkonservierung, wobei sie trotz derer eine hohe funktionelle Vielfalt in unterschiedlichen Zellen besitzen. Sie sind in Hefen und Säugetierzellen zentrale Faktoren bei der Regulation des Membrantransports und involviert in allen Schritten des Vesikeltransports (Bock *et al.*, 2001, Stenmark 2009). Dabei sind sie sowohl an der Vesikelabknospung als auch bei dem ersten Kontakt der Fusion von zwei Membranen entscheidend beteiligt. Neben der GTPase-Domäne besitzen sie einen Prenylanker, der im aktiven Zustand (GTP-gebunden) die Lokalisation an eine bestimmte Membran unterstützt. Dadurch können sie als selektive Marker verwendet werden, da sie jeweils an bestimmten Transportabschnitten beteiligt sind.

Als Beispiel sei hier Rab4 als ein Marker für das frühe Endosom und Rab11 als Marker für das apikale Recycling-Endosom zu nennen (s. Abbildung 2-2). Weiterhin ist Rab8 an dem basolateralen Transport beteiligt und kolokalisiert mit basolateralen Endosomen, wohingegen Rab9 zusammen mit Kompartimenten des späten Endosoms identifiziert wurde (Stenmark 2009).

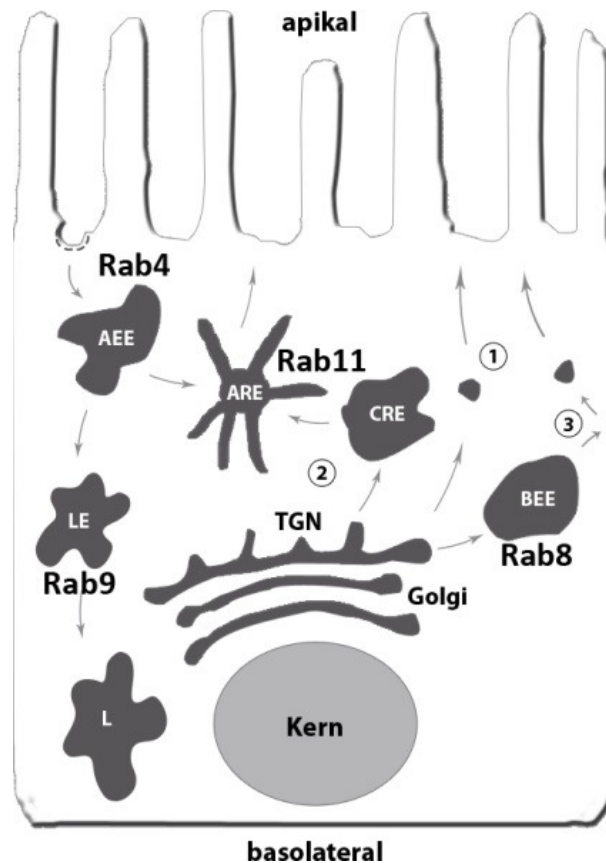


Abbildung 2-2 Transportwege der apikalen Sortiermaschinerie mit Rab-Markern für Endosomen

apical early endosome - AEE, apical recycling endosome - ARE, common recycling endosome - CRE, basolateral early endosome - BEE, late endosome - LE, Lysosom - L, Trans-Golgi-Netzwerk - TGN (nach dem Modell von Apodaca et al., 1994 und modifiziert nach Dissertation von Dominik Schneider).

2.2.2 Apikaler Proteintransport

Der apikale Proteintransport unterstützt die Aufrechterhaltung der Polarität eines Epithels. Er lokalisiert Proteine gezielt zur apikalen Plasmamembran und reguliert damit zellphysiologische Prozesse des Epithels. Die Proteine tragen dafür intrinsische Signale, die von Sortierkompartimenten erkannt werden und einen gezielten Transport ermöglichen. Die Sortiermaschinerie besteht aus unterschiedlichen Komponenten, wobei Rab GTPasen, Motorproteinen und dem Zytoskelett eine wichtige Rolle zugesprochen werden. Die Signale des zu transportierenden Proteins sind entweder direkt in der luminalen, zytoplasmatischen oder Membrandomäne zu finden oder werden durch posttranslationale Modifikationen in ER und Golgi reguliert.

Zur Untersuchung des Transports haben sich in den letzten Jahrzehnten aus unterschiedlichen Geweberegionen Zelllinien etabliert, mit denen die Regulation der Sortiermaschinerie

charakterisiert werden konnte. Diese wären aus der Niere MDCK- und LLC-PK-Zellen, aus dem Darm Caco-2- und HT-29-Zellen und aus der Leber native Leber-, WIF-B- und HEPG2-Zellen. Ein wichtiger Teilapparat des Sortiermechanismus bilden Vesikel, die den Transport von dem Golgi-Apparat zu der Plasmamembran ermöglichen. Diese Vesikel können sich dabei zu eigenständigen Sortierstationen (Endosomen) zusammenlagern und verbinden die endozytotischen mit den sekretorischen Transportwegen. Die endosomale Sortierung wurde zum ersten Mal in MDCK Zellen beschrieben (s. 3.9.1), wonach sich eine komplexe Landschaft an Sortierkompartimenten entwickelt hat, die bis heute noch nicht genau aufgeklärt ist. Identifiziert wurden das frühe apikale und basolaterale Recycling-Endosom (*apical early endosome* - AEE bzw. *basolateral early endosome* - BEE), das gemeinsame Recycling-Endosom (*common recycling endosome* - CRE) und das apikale Recycling-Endosom (ARE). Weiterhin wurde das späte Endosom (*late endosome* - LE) entdeckt, welches sich nahe dem Zellkern aufhält und eine Vorstufe zum Lysosom bildet.

Man unterscheidet anhand der Endosomen unterschiedliche Wege, wie ein Protein zur apikalen Seite gelangt. Der direkte Weg geht von dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran (PM) ohne dabei ein Endosom zu durchqueren (s. Abbildung 2-2 Nummer 1). Hinweise, dass dieser Weg existiert, gibt es allerdings bis jetzt nur wenige. Hua *et al.* untersuchten in einer Zeit-aufgelösten 3D-Visualisierung die Verteilung von einem GPI-verankertem Protein, wobei sie eine Sortierung komplett an die PM identifizierten, ohne dass das Protein in intrazellulären Kompartimenten akkumulierte (Hua *et al.*, 2006). Ein zweiter Weg beschreibt den Verlauf der Sortierung von dem TGN über endosomale Kompartimente zur PM (s. Abbildung 2-2 Nummer 2). Als Beispiel wären hier Studien von Cramm-Behrens *et al.* zu nennen, die zeigen konnten, dass die Proteine Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) und die Saccharase-Isomaltase (SI) endosomale Kompartimente durchlaufen, die Rab4, -8 und -11 positiv sind (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Weiterhin konnte eine Beteiligung des ARE an dem Transport von Endolyn und MUC1 identifiziert werden, wobei eine dominant-negative Mutante des Motorproteins MyosinVb die apikale Lokalisation beider Proteine verhinderte (Lapierre *et al.*, 2001, Mattila *et al.*, 2009). MyosinVb ist assoziiert mit Rab11, welches als Marker des AREs gilt. Der dritte Weg wird zunächst durch die Lokalisation zur basolateralen Seite beschrieben, woraufhin das Protein endozytiert wird und über Endosomen zur apikalen Seite gelangt (s. Abbildung 2-2 Nummer 3, Transzytose). Detailliert beschrieben wurde dieser Weg mit dem polymeren Immunglobulinrezeptor (pIgR) (Mostov 1994). Der Rezeptor wird zur basolateralen Seite (abhängig von 17 Aminosäuren nahe der Membrandomäne) transportiert und bindet dort Immunglobuline, woraufhin er endozytiert (abhängig von Tyrosinresten), in

Vesikel der Zelle sortiert und zur apikalen Seite transzytiert wird. Dort wird eine sekretorische Komponente des Rezeptors zusammen mit dem Liganden proteolytisch abgespalten, welche somit in das extrazytosolische Milieu gelangt.

Die Signale, die für den apikalen Proteintransport verantwortlich sind, können in mehrere Gruppen eingeteilt werden. Die historisch bekannteste Gruppe ist die der GPI-verankerten Proteine (**GlycosylPhosphatidylinositol**) auch kurz **GPI-APs** (**GPI-Anchored Proteins**). Dieser Anker besteht aus einem verzuckertem Phospholipid, welches posttranslational im ER an ein Protein, das ein entsprechendes Signal trägt, angehängt wird (s. Abbildung 2-3). Modifiziert wird der Anker im Golgi-Apparat durch weitere Zucker oder Phosphoethanolamine an der hydrophilen Kopfgruppe oder am Acylschwanz durch Acylierung am Inositolring und Austausch einzelner Fettsäuren bzw. des kompletten Diacylglycerolgrundgerüsts (DAG) zu einem Ceramid (Mayor *et al.*, 2004). Durch diese Verankerung bleiben die Proteine mit der Membran assoziiert und werden über den sekretorischen Weg zu PM transportiert.

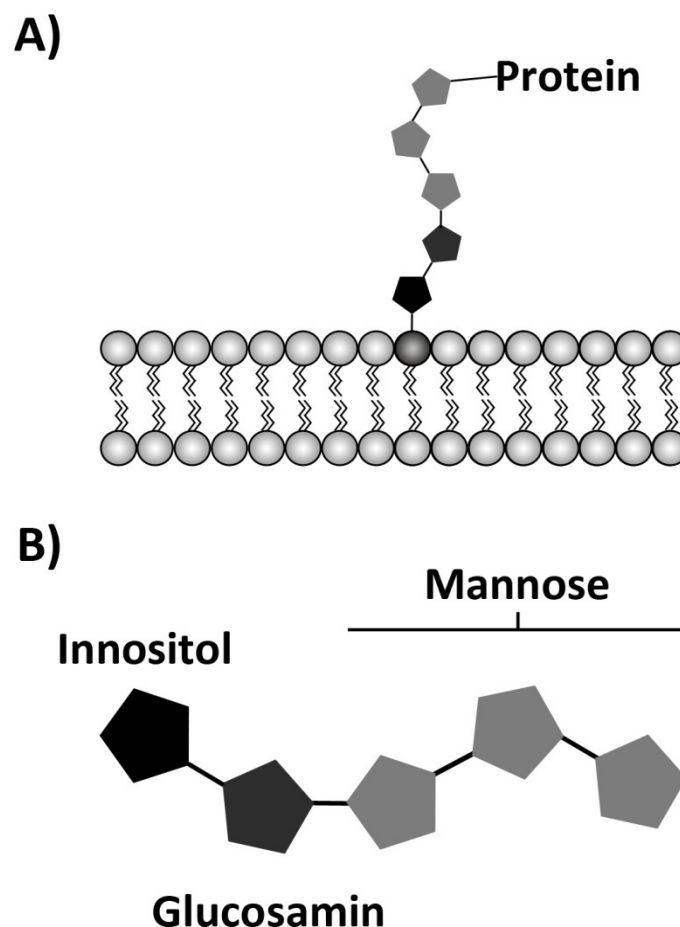


Abbildung 2-3 Struktur des Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker

GPI-verankerte Proteine assoziieren bedingt durch ihren hydrophoben Rest häufig mit **lipid rafts** (engl. Lipidfloß). Diese Strukturen sind ebenfalls für die Sortierung von nicht GPI-verankerten Proteinen verantwortlich und sollen deshalb als eine weitere Gruppe von apikalen Transportsignalen hier beschrieben werden. Sie bestehen aus Cholesterol- und Sphingolipidreichen Regionen in der Membran, die sich zusammenlagern und eigenständige funktionelle Areale in der Lipidschicht ausbilden (s. 2.4.2). Sie sind angereichert in der apikalen Membran von Epithelzellen, wobei die Konzentration graduell von dem Golgi-Apparat zur PM zunimmt (Rodriguez-Boulán *et al.*, 1989). Postuliert wird, dass durch die Bildung solcher **lipid rafts** GPI-verankerte Proteine, die in der exoplasmatischen Phase der zweischichtigen Membran einen gesättigten Acylanker besitzen, mit den **rafts** akkumulieren können. Des Weiteren ist beschrieben, dass Hämagglutinin (HA), welches eine membrandurchspannende Domäne besitzt, mit **lipid rafts** assoziiert und dass eine Mutation in dieser Domäne die Polarität des Transportes invertiert (Lin *et al.*, 1998). Ein anderes Sortiersignal zur apikalen Membran kann auf die **Glykosylierung** eines Proteins zurückgeführt werden. Es wird hierbei die N- und O-Glykosylierung unterschieden, die posttranslational an das Protein während der Prozessierung in dem Golgi-Apparat angefügt werden. Die N-Glykosylierung findet über ein Asparaginrest, die O-Glykosylierung über Serin- oder Threoninreste statt. Scheiffele *et al.* konnten schon früh nachweisen, dass ein Wachstumshormon aus der Ratte (*growth hormone* GH), welches sowohl apikal als auch basolateral sekretiert wird, durch N-Glykosylierung verstärkt über die apikale Membran abgegeben wird (Scheiffele *et al.*, 1995). Allerdings konnte eine Konsensussequenz nicht detektiert werden. Erst durch Arbeiten von Yeaman *et al.* konnten O-glykosylierte Regionen identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Sortierung von Proteinen haben. Der apikale Neurotrophinrezeptor p75 wird durch Deletion einer O-glykosylierten Stabregion, zur basolateralen Seite sortiert (Yeaman *et al.*, 1997). Ebenfalls zeigt eine Studie mit der apikal sortierten Saccharase-Isomaltase (SI), dass durch eine Mutation (Q117R) in der Stabregion der SI das Protein zufällig apikal wie basolateral verteilt vorliegt (Spodisberg *et al.*, 2001). Ein übergeordnetes Signal hat sich aber noch nicht bestätigt. Es wird vermutet, dass zum einen die sterische Konformation als auch die Kombination unterschiedlicher Glykane als Sortiersignal dienen (Weisz *et al.*, 2009).

Ein grundlegender Mechanismus der Sortierung ist die **Komplexierung** von Proteinen untereinander. Es wird davon ausgegangen, dass ein initialer Schritt für die Sortierung eine Trennung von Proteinen untereinander sein muss, was durch eine Verknüpfung zu hochmolekularen Clustern erklärt werden könnte. Hierüber ist noch nicht viel bekannt, wobei es Hinweise gibt, dass erst die Verknüpfung glykosylierter Proteine maßgebend ist, um apikal

sortiert zu werden. Hannan *et al.* konnten zeigen, dass GPI-APs in MDCK Zellen (*Wild-Typ*) komplexiert werden, bevor sie zur apikalen Seite gelangen (Hannan *et al.*, 1993). Dieses konnten sie mit Con A^R-Zellen, welche resistent gegen Concanavalin sind, da sie einen Glykosylierungsdefekt besitzen, nicht demonstrieren. Concanavalin gehört zur Gruppe der Lectine, welche unterschiedliche Glykane binden und mit sich selbst oligomerisieren können. Daher lag schon früh die Vermutung nahe, dass endogene Lectine einen Einfluss bei der apikalen Sortierung von Proteinen eine Rolle spielen könnten (Ikonen *et al.*, 1998). Mit der Identifizierung von Galectin-3 und -4 konnten zwei Galectine gefunden werden, die diese Theorie unterstützen. Galectine gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die ubiquitär in dem Organismus vorkommen und β -Galactoside binden können (s. 2.3). Durch Verknüpfung zweier Liganden oder Bildung von Oligomeren konnte mit Galectin-3 und -4 gezeigt werden, dass sie einen Effekt auf die Sortierung von apikalen Proteinen haben, wobei sie auf unterschiedlichen Wegen zur apikalen Seite gelangen. Mit Galectin-4 konnte eine Bindung an Sulfatide nachgewiesen werden und eine Assoziation mit dem *raft*-abhängigen Transport. Dahingegen bindet Galectin-3 Proteine, die mit dem *raft*-unabhängigen Transportweg verknüpft sind (Delacour *et al.*, 2005, Delacour *et al.*, 2008). Allerdings konnte noch nicht visualisiert werden, dass diese Proteine direkt mit Liganden in der Membran einen Cluster in der Zelle ausbilden.

2.2.3 Basolaterale Sortiersignale

Proteine, die basolateral sortiert werden, tragen intrinsische Signale in ihrer zytoplasmatischen Domäne, die ähnlich Endozytosesignalen sind. Basolaterale Motive sind hierbei häufig dominant gegenüber apikalen Sortiersignalen (Hunziker *et al.*, 1991, Casanova *et al.*, 1991, Jacob *et al.*, 1999). Diese Signale können aus einem NPXY-, einem tyrosinbasierten oder dihydrophobischen Motiv bestehen. Tyrosinbasierte Signale sind meist aufgebaut aus der Sequenz YXX ϕ , wobei X für eine beliebige und ϕ für eine hydrophobe Aminosäure steht. Dihydrophobische Motive bestehen entweder aus zwei Leucinen oder Isoleucinen (Duffield *et al.*, 2008). Zusätzlich zu diesen Signalen besteht die basolaterale Sortiermaschinerie aus Clathrin und heterotetrameren Adaptorproteinkomplexen. Clathrin ist ein Protein, das auch in der Endozytose und bei der initialen Einstülpung der Membran mitwirkt. Es bildet hierbei so genannte Stachelsaumbläschen aus (*clathrin-coated vesicles*) und induziert zusammen mit weiteren Adapterproteinen (AP) eine Membraninvagination. AP1, 2 und 3 scheinen an dem basolateralen Transport von Proteinen beteiligt zu sein, wobei AP1 am weitesten charakterisiert wurde (Apodaca *et al.*, 2012). Hierbei sind AP1a und AP1b (beide Bestandteile des Clathrin-Adapter-Komplexes) entscheidend an dem gezielten Transport von Proteinen beteiligt. AP1a ist ubiquitär exprimiert und involviert in dem Transport zwischen TGN und

Endosomen, wohingegen AP1b ausschließlich in Epithelien vorkommt, um dort die basolaterale Sortierung gezielt zu vermitteln (Fölsch *et al.*, 2003).

2.2.4 Endozytose

Die Zelle hat während der Evolution unterschiedliche Techniken entwickelt, um Substanzen in das Innere aufzunehmen. Wie vielfältig dabei die Wege sein können, haben Canton und Battaglia in einer Übersicht dargestellt. Es wird hierbei unterschieden, ob ganze Partikel aus der Umgebung der Zelle aufgenommen werden (Phagozytose), große Flüssigkeitsmengen an stark aufgekräuselten Membranregionen (Makropinozytose) oder ob die Aufnahme Rezeptor-vermittelt verläuft (Canton *et al.*, 2012). Die Rezeptor-vermittelte Endozytose wird eingeteilt in eine Flotillin-, ARF6-, CDC42-, Rho-, Caveolae- und Clathrin-abhängige Aufnahme von Substanzen, die in der Membran der Zelle verankert sind oder erst nach Bindung an ein Membranprotein eingeschleust werden. Am weitesten charakterisiert sind die so genannten Stachelsaumgrübchen (*clathrin coated pits*, CCP). Hierbei legt sich das Mantelprotein Clathrin von innen an die Membran an und verknüpft sich mit benachbarten Clathrinen zu einem Netzwerk, das zu einer Einstülpung der Membran führt (Ehrlich *et al.*, 2004). Unterstützt wird dieser Vorgang durch Adapterproteine, die den Komplex stabilisieren. Hierbei sind die Signale für die Initiation der Endozytose ähnlich der basolateralen Signale (s. 2.2.3). Caveoline dagegen sind Proteine, die als Membran-assoziierte Proteine sich in solchen Teilen der Membran aufhalten, die einen hohen Anteil an Cholesterol aufweisen. Sie zählen daher zu den *lipid raft*-abhängigen Markern, da sie mit *detergent-resistant membranes* (DRMs) isoliert werden können (Brown *et al.*, 1997). Sie bauen ähnlich der Clathrine ein Netzwerk aus, bevor die Endozytose der Membran stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass Caveoline als Membranspannungsregulatoren die Einstülpung der Membran beeinflussen können (Raucher *et al.*, 1999). Weiterhin können Proteine der Flotillin-Familie den Aufbau von Caveolae unterstützen, wobei es ebenfalls Studien gibt, die eine eigenständige Flotillin-abhängige Endozytose beschreiben (Frick *et al.*, 2007, Hansen *et al.*, 2009).

Nach der Endozytose gelangen Flotillin-, ARF6- und CDC42-abhängige Substanzen in *GPI-AP enriched early endosomal compartments* (GEECs), woraufhin sie mit einem frühen Endosom verschmelzen. Rho- und Caveolae-vermittelte Substanzen gelangen hingegen direkt zu einem frühen Endosom, wobei sie teilweise auch transzytiert werden können. CCPs bauen sich nach der Endozytose wieder ab und die Vesikel werden dann entweder transzytotisch weitergeleitet oder münden ebenfalls in frühen Endosomen, wodurch alle Substanzen, die Rezeptor-

vermittelt endozytiert wurden, sich im gleichen Kompartiment in der Zelle treffen können (Canton *et al.*, 2012).

2.3 Galectine

Galectine sind eine Klasse von Proteinen, die fähig sind β -Galactoside über ein konserviertes *carbohydrate recognition domain* (CRD)-Sequenzmotiv zu binden. Sie sind im Tierreich weit verbreitet und auch in Pilzen zu finden (Cooper 2002). Es wurden 15 Mitglieder identifiziert, die anhand ihrer CRDs eingeteilt werden, wobei diese Vielfalt in Invertebraten begrenzter vorzufinden ist. Galectine des Prototyps besitzen eine CRD, mit der sie untereinander Dimere ausbilden können (Galectins-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15). Die nächste Gruppe wird als *tandem repeat* (TR) bezeichnet, da sie aus zwei CRD-Untereinheiten bestehen, die kovalent miteinander verknüpft sind (Galectin-4, -6, -8, -9 und -12). Hierbei können die CRDs unterschiedliche Spezifitäten zu Glykanen aufweisen (Carlsson *et al.*, 2007). Galectin-3 nimmt eine gesonderte Rolle der Proteinfamilie ein, da es als einziges eine CRD-Domäne besitzt, an der sich eine N-terminale Domäne anschließt, die reich an Prolinen und Glycinen ist (chimärer Typ) (Hirabayashi *et al.*, 1993). Diese Domäne ist mitverantwortlich für eine starke Oligomerisierung des Proteins (s. Abbildung 2-4).

Galectine sind, obwohl sie keine sekretorische Signalsequenz besitzen, neben dem Zytosol und dem Nukleus auch extrazellulär zu finden (Cooper 2002). Sie werden über einen nicht-klassischen Sekretionsweg aus der Zelle ausgeschleust, um schließlich wieder über die Endozytose in die Zelle aufgenommen zu werden (Sato *et al.*, 1994, Dissertation Dominik Schneider).

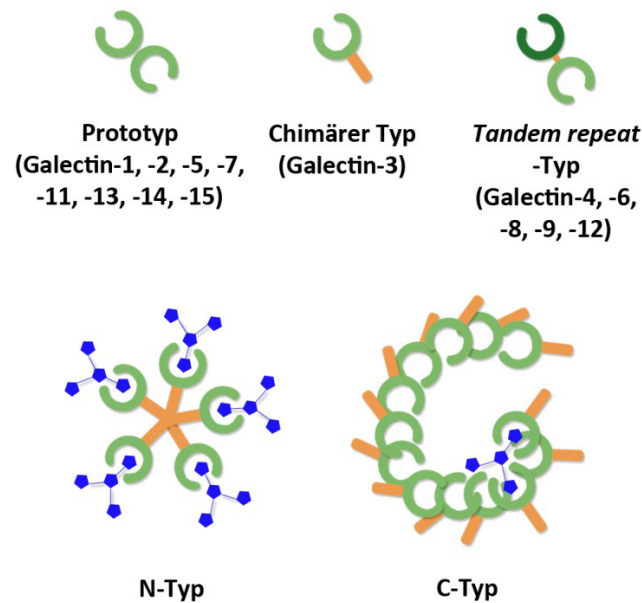


Abbildung 2-4 Einteilung der Galectine und Typisierung der oligomeren Form von Galectin-3

Galectine werden eingeteilt in drei Klassen (Proto-, chimärer und *tandem repeat*-Typ). Dargestellt sind jeweils die *carbohydrate recognition domain* (CRD, grün), Linkerregionen bzw. die N-terminale Domäne (braun) und ein Zuckerligand (blau). Weiterhin sind zwei Modelle der Oligomerisierung von Galectin-3 zu sehen (N-Typ, C-Typ nach Lepur *et al.*, 2012).

2.3.1 Struktur und Zuckerspezifitäten von Galectin-3

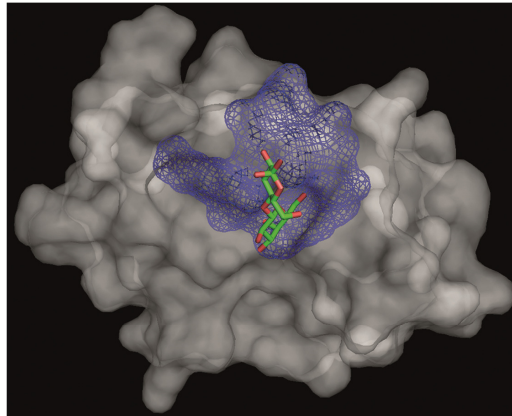
Allgemein sind Saccharid-vermittelte Funktionen von Galectinen auf den Extrazellulärraum bzw. das Lumen von Zellkompartimenten beschränkt, da sie nur dort vorkommen. Eine multivalente Bindung an Zuckerliganden verstärkt die Interaktion und eine Verlinkung von Liganden untereinander könnte Signalübertragungen in der Zelle regulieren. Daher ist die Spezifität gegenüber gewissen Liganden Gegenstand der Forschung, um die Physiologie von Galectinen in der Zelle besser zu verstehen. Im Allgemeinen binden alle Galectine Lactose- und LacNAc-integrierte Saccharide, worüber sie ihre Funktion vermitteln. Diese Zuckerverbindungen sind in fast allen N- bzw. O-Glykanen zu finden, wobei die genauen Spezifitäten einzelner Galectine noch größtenteils ungewiss sind. Ebenfalls sind noch keine Parameter bekannt, welche bspw. einen Wechsel von Liganden untereinander erklären könnten (Horlacher *et al.*, 2010).

Galectin-3 besitzt eine CRD, mit der es einen Zucker der Gruppe der β -Galactoside binden kann, wobei die initiale Bindung zu dem Monosaccharid Galactose gering ist. Die Bindungsintensität nimmt mit Lactose zu und wird nochmal verstärkt durch die N-Acetylierung

der Lactose. Die Dissoziationskonstanten liegen hierbei auf einem Niveau von über 100 μM (Sörme *et al.*, 2002). Wird LacNAc weitergehend fucosyliert, steigt die Affinität von Galectin-3 erheblich an. Diese Spezifität konnte für andere Galectine nicht detektiert werden. Des Weiteren erhöht sich die Bindung durch 3'-O-Glykosylierung des nach innen gerichteten Galactose-Teils von LacNAc und durch Anhängung einer Mannose an dem nach außen gerichteten Glucose-Teil von LacNAc (s. Abbildung 2-5), wobei die Orientierung des Lactose-Grundgerüsts gleich bleibt. Eine weitere Spezifität wurde für das H-Antigen erkannt, welches am 3'-O des Glucose-Teils im LacNAc modifiziert ist und die Bindung damit verstärkt. Dies zeigten Studien von Horlacher *et al.*, die Affinitäten von Galectinen zu unterschiedlichen Sacchariden mit einem *carbohydrate microarray* (engl. Karbohydratmikroanordnungssystem) nachweisen konnten (Horlacher *et al.*, 2010).

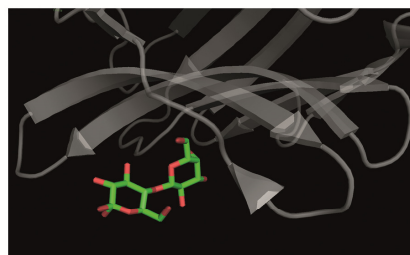
Die Bindungstasche von Galectin-3 ist aufgeteilt in fünf Bereiche (A-E), wobei die Bereiche C und D verantwortlich für die initiale Bindung der Lactose sind (s. Abbildung 2-5A, Leffler *et al.*, 2004). Alle weiteren Zuckerverbindungen bauen darauf auf und Mutationen in diesen Bereichen führen zu einem Bindungsverlust des Liganden. Die Aminosäuren, die dafür maßgebend sind, sind Histidin (Position 158), Asparagin (Position 160 und 174), Arginin (Position 162 und 186) und Glutamat (Position 184), welche in der Familie der Galectine konserviert sind. Wie schwerwiegend eine Mutation in diesen Regionen sich auswirkt, konnten Lepur *et al.* in Fluoreszenzpolarisationsanalysen zeigen (s. 3.5.2 und Lepur *et al.*, 2012). Die anderen Bereiche (A, B und E) bieten Platz für weitere Zuckerreste eines Oligosaccharids und eine Anpassung dieser Reste kann die Bindung sowohl positiv als auch negativ beeinflussen.

A)

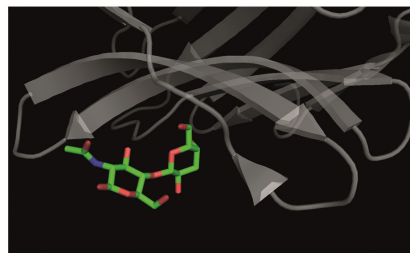


B)

Lactose



LacNAc



GM1

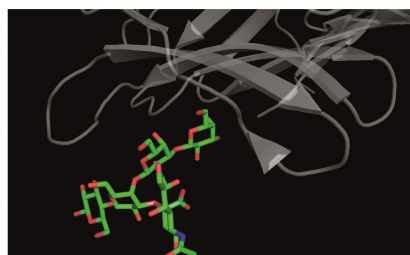


Abbildung 2-5 Orientierung von Liganden in der Bindungstasche von Galectin-3

A) Zu sehen ist die Orientierung von Lactose in der Bindungstasche einer verkürzten Form von Galectin-3. Der Ligand ist in der Stabstruktur dargestellt, wohingegen die Oberfläche des Proteins im Hintergrund dargestellt ist (grau, transparent). Zusätzlich sind die Aminosäuren der C- und D-Bindungsstelle als Netzwerkstruktur markiert (blau). **B)** Abgebildet ist die Orientierung von drei Liganden (Lactose, N-Acetyllactosamin (LacNAc) und die Kopfgruppe des Glykolipids GM1), die mit Galectin-3 kristallisiert wurden (graue β -Faltblattstruktur, transparent). Die Bilder sind auf Grundlage der Strukturdaten der PDB-Datei 3ZSJ (**A** und **B oberstes Bild**), 2XG3 und 3AYC entsprechend entstanden und wurden mit der Software Pymol in der Version 1.21 entworfen.

2.3.2 Lipidinteraktion von Galectinen

Galectine binden glykosylierte Liganden, die in Form von freien Glykanen, Proteinen oder Glykolipiden in der Zelle vorkommen. Glykolipide sind angereichert in der apikalen Membran von Epithelzellen und stellen einen potentiellen Rezeptor für Galectine dar, um den apikalen Transport zu regulieren. Es wird geschätzt, dass ca. 500 unterschiedliche Karbohydratstrukturen auf Glykolipiden vorkommen (Futerman *et al.*, 2004), wobei die Funktion in der Zelle bei den meisten Strukturen noch unklar ist.

Galectin-1 kann mit dem Glykolipid GM1 in menschlichen Neuroblastomzellen interagieren und deren Zellwachstum und Differenzierung beeinflussen (Kopitz *et al.*, 1998). Galectin-4 und -8 binden an Sulfatide, wobei Galectin-4 eine wichtige Rolle im *lipid raft*-abhängigen Transport spielt (Delacour *et al.*, 2005 und Ideo *et al.*, 2003). Weiterhin zeigen Studien von Mishra *et al.*, dass Galectin-9 das Recycling des Forssmanglykolipids beeinflussen kann. Galectin-9 ist wichtig für die Bildung der Polarität in MDCK II Zellen und das Forssmanglykolipid dient hierbei als Rezeptor für den Transport des Proteins zum Golgi-Apparat (Mishra *et al.*, 2010). Ebenfalls konnten Kopitz *et al.* in aktuellen Studien zeigen, dass Galectin-4 an der Bindung zu GM1 in Konkurrenz mit Galectin-1 steht, wobei Galectin-4 nicht das Wachstum der Neuroblastomzellen beeinflussen kann (Kopitz *et al.*, 2012).

In der Literatur gibt es mehrere Hinweise, dass auch Galectin-3 an Lipide binden kann. 1996 konnten Mey *et al.* zeigen, dass Galectin-3 mit Lipopolysacchariden (LPS) aus *Klebsiella pneumoniae* interagiert und dass diese Bindung durch Lactosezugabe inhibiert wird, was auf eine Zucker-abhängige Interaktion über die C-terminale Domäne hinweist. Interessanter Weise konnte ebenfalls eine Interaktion mit den Lipopolysacchariden (LPS) aus *Salmonella minnesota* R7 nachgewiesen werden, welche keine β -Galactoside in ihrem komplex-verzweigtem Zuckerkopf besitzen. Diese Bindung konnte nicht durch Lactose inhibiert werden, was auf eine C-terminal-unabhängige Bindung hindeutet (Mey *et al.*, 1996). Lukyanov *et al.* demonstrierten beeindruckende Daten zur Interaktion mit Phospholipiden und Cholesterol, mit denen sie postulierten, dass Galectin-3 in einem Energie-unabhängigen Prozess die Lipidmembran von der einen zur anderen Seite überqueren kann (Lukyanov *et al.*, 2005). Eine weitere Interaktion mit Glykosylphosphatidylinositolankern (GPI) von *Toxoplasma gondii* wiesen Debierre-Grockiego *et al.* nach, wonach die Bindung sowohl über die alleinige Glykankopfgruppe des GPIs als auch über Diacylglycerol (DAG) stattfinden kann (Debierre-Grockiego *et al.*, 2010).

2.3.3 Oligomerisierungseigenschaften von Galectinen

Eine weitere Modifikation von Proteinen stellt die Oligomerisierung dar. Durch Verknüpfung zweier oder mehrerer Untereinheiten können neue Funktionen wie beispielsweise allosterische Regulation oder Etablierung höher-geordneter Komplexitäten entstehen. Es wird davon ausgegangen, dass ca. 35 % der Proteine in der Zelle als Oligomer vorliegen, was wahrscheinlich auf einen evolutionären Vorteil zu begründen ist (Ali *et al.*, 2005). Dabei werden oligomere Proteine über ihre Untereinheiten, die Stärke der Bindung untereinander, die Halbwertszeit und deren Avidität klassifiziert. Proteine, die nach der Faltung direkt miteinander ein Dimer oder höhere Oligomere eingehen, zeigen meist Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich, wohingegen solche, die durch ihre Umgebung (pH, Temperatur) induziert oligomerisieren, mikro- oder millimolare Dissoziationskonstanten aufweisen.

Galectine sind dafür bekannt Oligomere auszubilden. So kommt Galectin-1, klassifiziert als prototypisches Lectin, als Dimer in der Zelle vor. Galectin-3 gehört zu den wenigen Proteinen der Galectinfamilie, die komplexere Oligomere ausbilden können, wodurch gleichzeitig mehrere Liganden vernetzt werden können. Diese Quervernetzung kann Signalwege aktivieren bzw. hemmen, Zelladhäsion fördern und eine Galectin-Glykoprotein-Schicht in der Plasmamembran ausbilden (Nieminen *et al.*, 2007). Somit wird der Oligomerisierung von Galectin-3 eine entscheidende Rolle in der Regulation zellphysiologischer Prozesse zugesprochen, wobei dessen Einfluss auf den Liganden und das Verhalten im Endosom der Zelle noch nicht näher charakterisiert wurde. Es wird vermutet, dass es als Pentamer unterschiedliche Liganden miteinander quervernetzen kann (Ahmad *et al.*, 2004a). Bei diesem Modell (N-Typ) verknüpft sich Galectin-3 über seine N-terminale Domäne mit sich selbst, nachdem es einen komplexen Zuckerliganden gebunden hat. Die Mutante Galectin-3 Δ N, bei der die N-terminale Domäne deletiert ist, kann bei gleicher Konzentration nur gering mit einem Liganden oligomerisieren (Lepur *et al.*, 2012). Ein weiteres Oligomerisierungsmodell von Galectin-3 wurde von Lepur *et al.* zum ersten Mal beschrieben, bei dem Galectin-3 über seine C-terminale Domäne miteinander verknüpft wird (C-Typ). Dieses Modell würde dafür sprechen, dass am Anfang einer Oligomerisierung ein Ligand den Vorgang induziert, dass aber darauffolgend keine weiteren Liganden nötig sind, um den Effekt zu verstärken (Lepur *et al.*, 2012, s. Abbildung 2-4).

2.4 Lipide

Lipide bilden die Grenze der Zellen und trennen das Zytoplasma von dem Extrazellulärraum. Dies hat evolutionär den Vorteil, dass Reaktionen, die im gleichen Raum gegenseitig stören

könnten, getrennt voneinander ablaufen. Als Beispiel ist hier der Glucosestoffwechsel zu nennen, bei dem wichtige katabole und anabole Schritte in getrennten Kompartimenten ablaufen. Die Bildung einer Membran ist dabei mit dem amphiphilen Charakter der Lipide zu erklären. Sie sind aufgebaut aus einem hydrophoben Schwanz und einer hydrophilen Kopfgruppe, so dass sie in wässriger Lösung dazu tendieren Mizellen auszubilden.

2.4.1 Einteilung und Struktur

Lipide werden in acht Klassen eingeteilt, was auf ihre chemische Struktur zurückzuführen ist: Fettsäuren, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Sterole, Prenole, Glykolipide und Polyketide. Für diese Arbeit waren die Sterole, Glycerophospholipide und Glykolipide von besonderer Bedeutung, weshalb im Folgenden näher auf diese Lipide eingegangen wird.

Sterole besitzen als Grundgerüst ein Gonan, das mit unterschiedlichen chemischen Gruppen substituiert werden kann. Durch ihre strukturelle Vielfalt bringen Sterole eine Reihe von physiologischen Aufgaben in die Zelle mit. So sind sie an der hormonellen Regulation, dem Verdauungsprozess, der Gewebeentwicklung und der Membranpermeabilität beteiligt. Der bekannteste Vertreter ist das Cholesterol, das aus der Verknüpfung mehrerer Prenylgruppen entsteht, wobei ein Zwischenprodukt für die Synthese von Tocopherol (Vitamin E) verwendet wird. Cholesterol ist in allen Zellen vorhanden und ist eine wichtige Komponente der Membranlipide. Es ist Teil der *lipid rafts* und kann die Rigidität der Membran in Anwesenheit von Glycerophospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren erhöhen und konträr dazu in Anwesenheit von gesättigten Glycerophospholipiden und Sphingolipiden die Rigidität erniedrigen (Maxfield *et al.*, 2010). Ebenfalls beeinflusst es die Phasenseparierung von gewissen Lipiden, die ohne Cholesterol keine Separierung eingehen würden (Marsh 2009).

Glycerophospholipide bestehen aus einem Glycerolphosphat-Grundgerüst verknüpft mit einer hydrophilen Kopfgruppe an Position sn-3 und Fettsäuren oder Fettalkoholen an den verbleibenden Positionen. Es werden 7 Klassen von Glycerophospholipiden entsprechend ihrer Kopfgruppe unterschieden: Phosphatidsäure, Phosphatidylserin, Cardiolipin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylcholin. Diese Lipide können in der Zelle u.a. neben der Grundsubstanz für die Membran auch als *second messenger* wirken, wodurch Signalwege in der Zelle angeschaltet werden (Hughes *et al.*, 1988). Bei der Initiierung der Signalwege spielen Phospholipasen eine wichtige Rolle, die an spezifischen Stellen Glycerophospholipide spalten können.

Glykolipide bestehen aus einem nicht phosphorylierten SphingosinGrundgerüst, das an einer Stelle glykosyliert vorliegt. Die Glykane können dabei einfach bis komplex-verzweigt sein. Es wird geschätzt, dass ca. 500 unterschiedliche Glykolipide in der Zelle vorkommen (Futerman *et al.*, 2004), wobei die Funktion für diese hohe Vielfalt noch weitestgehend unbekannt ist. Die Synthese findet im Golgi-Apparat mit Hilfe von Glykosyltransferasen statt (Maccioni, 2007). Glykolipide übernehmen vielfältige Aufgaben in der Zelle, da sie mit Hilfe ihrer Kopfgruppe mit Zucker-bindenden Proteinen interagieren können. Das Gangliosid GM1 dient als Rezeptor für Proteine des Bakteriums *Vibrio cholerae*. Im Fall von *Shigella dysenteriae* ist es Gb3, das den Weg des Bakteriums in die Zelle vermittelt. Weiterhin werden Ganglioside als Tumormarker verwendet, da sie bei vielen Krebsarten in der Zelle stärker synthetisiert werden. Galectine interagieren ebenfalls mit Glykolipiden und unterstützen den Transport der Lipide in der Zelle (s. 2.3.2). Durch ihren amphiphilen Charakter sind sie Bestandteil von *lipid rafts* und stabilisieren Mikromembrandomänen (van Meer *et al.*, 2005), was im folgenden Unterkapitel näher erklärt wird.

2.4.2 Lipidtrafficking und die Theorie der *lipid rafts*

Die Lipidkompositionen einzelner Zellkompartimente divergieren entsprechend ihrer Funktion und Lokalisation, wobei die *de novo* Synthese nur im endoplasmatischen Retikulum möglich ist. Daher braucht die Zelle ein effektives Transportsystem, um Lipide von dem ER zu den benachbarten Membranabschnitten zu transportieren, da Lipide wegen ihres hydrophoben Charakters nicht durch eine wässrige Lösung diffundieren können. Zum einen findet der Transport über Vesikel von einer Donor- zu einer Akzeptormembran statt. In der Akzeptormembran sitzen spezifische Enzyme, die die Lipide gezielt in diesem Kompartiment modifizieren, so dass die Funktion der Lipide dort erst aktiviert wird. Weiterhin gibt es Transportproteine, die über eine hydrophobe Tasche Lipide ähnlichen Typs binden können und mit Hilfe von Rezeptoren in der Akzeptormembran gezielt ein Lipid in ein Kompartiment transportieren. Kommen zwei Membranen nahe aneinander, kann ein Austausch von Lipiden auch ohne Proteine stattfinden. Sinkt der Anteil an Wassermolekülen zwischen den beiden Membranen unter einen kritischen Wert, können Lipide spontan von einer zur anderen Seite wechseln. Ebenfalls können die Lipidtransport-Modelle kombiniert werden, um die Effektivität zu verbessern (Blom *et al.*, 2011).

Neben der vertikalen Sortierung von Lipiden von einer auf die andere Membran, ist auch die laterale Sortierung wichtig für das Trafficking von Proteinen und Lipiden. Hierbei spricht man von einer Phasenseparation, wobei sich gewisse Lipide aneinanderlagern können und damit

die Membran in getrennte Bereiche einteilen. Vesikel, die aus solchen Membranbereichen abknospen, tragen dann solche Proteine und Lipide in ihrer Membran, die mit diesen Membranbereichen assoziieren. Erste Thesen zu dieser Theorie kamen 1988 auf, wonach Simons und van Meer den Transport von Proteinen und Lipiden beschrieben und postulierten, dass dies in denselben Vesikeln geschehen kann. Knapp 10 Jahre später erschien die Theorie, dass sich Proteine und Lipide in der Membran zu eigenen organisierenden Zentren zusammenlagern können und so genannte Flöße (*lipid rafts*) bilden, von denen gezielt der Transport in Vesikeln gestartet werden kann (Simons *et al.*, 1997). Ebenfalls postulierten sie, dass *lipid rafts* mögliche Eintrittsstellen für Viren oder andere Pathogene an der Plasmamembran sein könnten. Seit dieser Zeit wurde versucht, die Existenz der *lipid rafts* zu beweisen. Dass Lipide fähig sind Phasenseparation auszubilden, konnte schon früh bewiesen werden ((Meyer, 1981), (Meyer, 1983), dass aber auch Proteine sich abhängig ihrer Struktur in diesen Phasen aufhalten und gezielt darüber transportiert werden, konnte lange Zeit nicht dargestellt werden. Erste Hinweise lieferten GPI-APs, die zusammen mit Cholesterol und Sphingolipiden in angereicherten Membranfragmenten isoliert werden konnten (Brown *et al.*, 1992). Auf starke Kritik stieß die Methode der Isolation, da sie mit Detergenzien wie Triton X100 vorgenommen wurde. Es stellte sich heraus, dass Proteine in Abhängigkeit des verwendeten Detergenz nur mit gewissen Membranfragmenten assoziierten. Daher wird das Modell der *lipid rafts* bis heute in Frage gestellt (Munro, 2003, Shaw, 2006). Neuere Studien konnten die Existenz von *lipid rafts* in der Membran von Erythrozyten mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (s. 3.6.4) nachweisen (Cai *et al.*, 2012), wobei die Größe, die Abhängigkeit der Stabilität von Cholesterol und die Assoziation gewisser Proteine mit den Lipidstrukturen bestätigt wurde.

Definiert wurden *lipid rafts* auf einer Konferenz, bei der Biophysiker, Biochemiker und Zellbiologen zusammen kamen, um in einem Konsens die schwer erfassbaren Mikrodomänen strukturell und funktionell zu erklären:

“Membrane rafts are small (10-200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes. Small rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein-protein and protein-lipid interactions.” (Pike, 2006)

2.4.3 Membranmodelle

Zur Vereinfachung der komplexen Wechselwirkung zwischen Proteinen und der Zellmembran, werden Modelle verwendet, die eine native Zellmembran nachahmen sollen. Durch ihren

amphiphilen Charakter bilden Lipide in Wasser spontan Mizellen aus, bei dem die hydrophile Kopfgruppe Richtung Wasser zeigt und die hydrophoben Acylschwänze sich eng aneinanderlagern (bidirektional). Dieses Modell ahmt nur bedingt eine Zellmembran nach, da keine zweischichtige Membran vorhanden ist. Diese entsteht ebenfalls spontan in Abhängigkeit des Lipids, welches zusammen mit Wasser gemischt wird, da hierbei die Form des Lipids entscheidend ist. Lipide die durch ihre sterische Konformation eher zu einer konischen Form tendieren, bilden Micellen aus, solche allerdings, die eine zylindrische Form besitzen, bilden spontan eine zweischichtige Membran (Mouritsen 2011).

Man unterscheidet die Membranmodelle anhand ihrer Schichten. Wie oben erwähnt sind Mizellen bidirektional ausgerichtet; dies ist ebenfalls bei der LMA-Methode (s. 3.3.1.2) der Fall, bei dem die hydrophile Kopfgruppe Richtung Wassermoleküle zeigt und der Schwanz in die Luft. Zweischichtige Membranmodelle werden weitergehend nach ihrer Größe und Form spezifiziert. *Supported lipid bilayers* (SLBs) sind Membranen, die flach auf einer Glasoberfläche gebildet werden. Kreisförmige zweischichtige Membranen heißen Liposomen und sind geschlossen in sich selbst. Sie werden unterteilt in *small unilamellar vesicles* (SUV, < 100 nm im Durchmesser), *large unilamellar vesicles* (LUVs, < 1.000 nm im Durchmesser) und *giant unilamellar vesicles* (GUVs, > 1.000 nm). Der Vorteil von GUVs ist, dass sie eine Größe besitzen, um lichtmikroskopische Untersuchungen durchführen zu können (Bagatolli, 2006, 1010). Des Weiteren werden diese Modelle mit einer genau definierten Lipidkomposition und Lipidkonzentration synthetisiert, so dass Proteineffekte spezifiziert werden können. Allerdings stoßen diese Modelle genau bei diesem Punkt an ihre Grenzen, da komplexere Lipide, die sich durch weitreichende Zuckerstrukturen oder aber durch facettenreiche Acylgruppen definieren, nur schwer mit diesen Modellen nachbauen lassen. Deswegen gibt es Liposomen, die aus der zu untersuchenden Zellmembran abstammen. Hierbei werden zwei unterschieden, was allein auf Grund ihrer Isolationsmethode beruht. *Plasma membrane spheres* (PMSs) werden mit einer hohen Konzentration an Glucose im Puffer isoliert und *giant plasma membrane vesicles* (GPMVs) können mit einer Mischung aus Kalzium und einem Reduktionsmittel aus der Zellmembran hergestellt werden.

2.4.3.1 Giant plasma membrane vesicles (GPMV)

Diese Art der Vesikel besteht aus der nativen Plasmamembran der zu untersuchenden Zellen, welche eine Größe von bis zu 30 µm aufweisen, wozu sie für fluoreszenzmikroskopische Methoden verwendet werden können, um Protein-Lipid-Interaktionen zu illustrieren.

Das Modell wurde 1976 zum ersten Mal beschrieben, 2007 von Tobias Baumgart weiterentwickelt und schlussendlich 2012 durch Ilya Levental und Michal Grzybek in der Weise verfeinert, dass eine Phasenseparation von Proteinen und Lipiden beobachtet werden konnte, die nicht durch Fixanzen beeinflusst wird (Scott 1976, Baumgart *et al.*, 2007, Levental *et al.*, 2011).

Dabei ist nicht genau bekannt, inwiefern der Mechanismus zur Isolierung abläuft. Es konnte gezeigt werden, dass durch Induktion mit Kalzium und N-Ethylmaleinimid (NEM) (Reduktionsmittel) die Zelle ihre Plasmamembran nach oben auswölbt und nach entsprechender Inkubationszeit die Membran von der Oberfläche abgibt. Welche molekularbiologischen Grundlagen dabei dahinter stehen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Keller *et al.* beschrieben, dass durch Behandlung der Zelle mit dem Reduktionsmittel DTT der Influx von Kalzium verstärkt wird und dies die Aktivierung der Phospholipase C bewirkt (Keller *et al.*, 2009). Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) und verhindert dadurch eine Verbindung des Aktinzytoskeletts mit der Plasmamembran, was wiederum die Zelle instabilisiert und mit einer Ausstülpung der Membran einhergehen kann. Ein weiteres Enzym, das durch Kalzium aktiviert wird, ist die Scramblase, die das so genannte *flip-flop* von Phospholipiden fördert und damit die Asymmetrie dieser Lipide in der Membran aufhebt. So kommt vermehrt Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite der Zelle, welches den Vorgang der Apoptose einleiten kann. Von der Apoptose ist bekannt, dass Zellen währenddessen die Plasmamembran ausstülpfen und bei mechanischem Stress sich Vesikel von der Plasmamembran lösen können.

2.5 pH-abhängige Prozesse in der Zelle

Der pH-Wert ist ein Maß für die annähernde Konzentration von Protonen in einer verdünnten, wässrigen Lösung. Der Mensch besteht zu 70 % aus Wasser, weswegen ein Großteil der chemischen Stoffwechselreaktionen in einer wässrigen Umgebung stattfinden, die durch den pH-Wert beeinflusst werden. Er reguliert eine Vielzahl von normalen und pathogenen Prozesse wie Zellproliferation, Zell-Zyklus-Verlauf und Differenzierung (Srivastava *et al.*, 2007).

Ein bekannter pH-Sensor ist das Hämoglobin, das Sauerstoff bei azidem pH freilässt und bei neutralem pH stärker an sich bindet. Dies steht in Abhängigkeit zu dem CO₂-Partialdruck des Blutes, wobei bei steigendem Druck die Freisetzungsrates von Sauerstoff sich erhöht (Bohr Effekt). Der Effekt wird über eine Histidin-Aspartat-Brücke ausgeübt, welche sich aufhebt,

wenn das Histidin durch erhöhten pH protoniert wird (Lukin *et al.*, 2004). Weitere pH-Sensoren sind das Hämagglutinin des Influenza Virus, das durch eine strukturelle Verschiebung einer α -Helix Membranfusionen induzieren kann, das Prion-Protein PrP, welches Aggregate nur in einem gewissen pH-Bereich ausbildet und das Cofilin, das die Bündelung von Aktinfasern kontrolliert.

Diese pH-bedingten Veränderungen in Proteinen sind abhängig von den pKa-Werten der einzelnen Aminosäuren in dem Protein. Der pKa-Wert einer Aminosäure liegt an diesem pH vor, wenn 50 % aller protonierbaren Gruppen protoniert sind. Der Wert kann dabei durch benachbarte Aminosäuren beeinflusst werden. Bspw. liegt der pKa-Wert eines freien Histidins bei 6,5, der durch anliegende Aminosäuren erhöht bzw. gesenkt werden kann (Srivastava *et al.*, 2007). Da Histidine als einzige Aminosäure um den pH von 6-7 protoniert werden, kommt dieser Aminosäure eine besondere Rolle zu, da ein Großteil der pH-abhängigen Reaktionen in der Zelle in diesem Bereich stattfinden.

Der pH-Wert des Zytoplasmas ist neutral und geringe Schwankungen von 0,3 - 0,4 pH Einheiten können die Zelle in die Apoptose führen (Boussouf *et al.*, 2000). Um parallel pH-abhängige Prozesse ablaufen zu lassen, benutzt die Zelle den Weg über Kompartimente. Angesäuerte Kompartimente sind der Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen und sekretorische bzw. synaptische Vesikel. Der pH schwankt in diesen Kompartimenten zwischen 4,5 und 6,5. Hierbei bewegt sich der pH in frühen und späten Endosomen zwischen 5,5 - 6,0, in Recycling-Endosomen zwischen 6,0 - 6,5 und im Lysosom kann er bis auf 4,5 fallen. Sekretorische Vesikel sind ebenfalls angesäuert und haben einen pH zwischen 5,0 - 5,5 (s. Abbildung 2-6, Weisz 2003, Huotari *et al.*, 2011). Erzeugt wird die Ansäuerung durch Aktivierung von vakuolären ATPasen in Kombination mit unterschiedlichen Transportern und Ionenkanälen (Weisz 2003). Ein Beispiel für einen pH-abhängigen Prozess in Endosomen ist der Transferrinrezeptor, der bei neutralem pH Transferrin bindet, woraufhin der Komplex aus beiden endozytiert wird. Eine Ansäuerung des Organells führt zu einer Senkung der Affinität zwischen Rezeptor und Ligand, wodurch Transferrin freigelassen wird und der Rezeptor zur Plasmamembran zurücktransportiert wird (Mayle *et al.*, 2012).

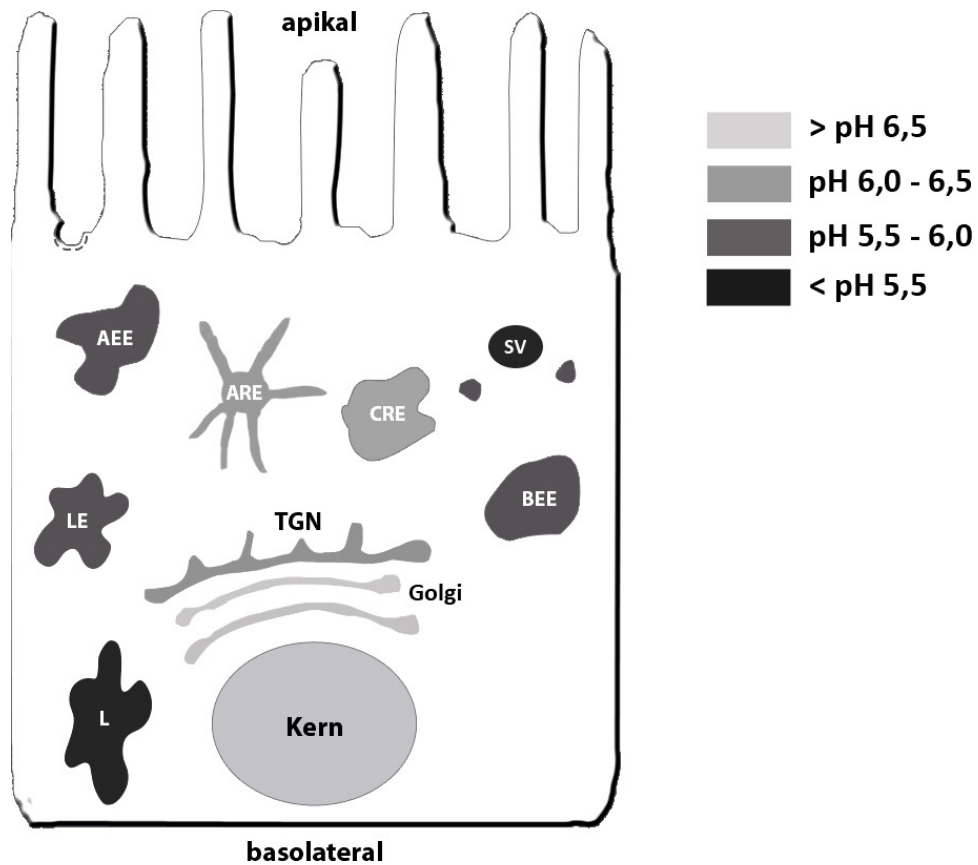


Abbildung 2-6 Azidifizierte Kompartimente in der Zelle

apical early endosome - AEE, apical recycling endosome - ARE, common recycling endosome - CRE, basolateral early endosome - BEE, SV - sekretorisches Vesikel, late endosome - LE, Lysosom - L, Trans-Golgi-Netzwerk - TGN

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Polarität eines Epithels wird durch unterschiedliche Kontrollmechanismen aufrechterhalten. Galectine werden als ein Kontrollorgan der Zelle beschrieben, wobei sie ein weites Wirkspektrum aufzeigen und ubiquitär in der Zelle vorhanden sind. Sie binden an β -Galactoside und können Liganden miteinander verknüpfen und unterstützen auf diese Weise den gerichteten Transport von Proteinen in endosomalen Kompartimenten. Galectin-3 spielt hierbei eine gesonderte Rolle, da es über seine N-terminale Domäne eine komplexe Oligomerisierung eingehen kann.

Ziele dieser Arbeit waren es neue Spezifitäten von Galectin-3 zu definieren, um die vielfältigen Funktionen des Proteins zu konkretisieren. Da Glykosphingolipide angereichert an der apikalen Plasmamembran vorzufinden sind, sollte eine Interaktion mit Lipiden untersucht werden. Dies sollte mittels spektroskopischen und klassischen biochemischen Methoden umgesetzt werden. Hierfür sollten zum einen Kinetikmessungen mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation und zum anderen Lipidinteraktionen über Dichtegradienten-Zentrifugation und Bindungsanalysen an Lipid-beschichteten Nitrozellulosemembranen durchgeführt werden. Ebenfalls sollten die Eigenschaften der Oligomerisierung des Proteins in *in vitro* Studien näher bestimmt werden, um den Einfluss während der Sortierung zu definieren. Hierbei sollten neue Methoden etabliert werden, die die Bindung zu komplexen Glykoliganden in Lösung und in einer möglichst nativen Membran visualisieren konnten. Das Modell der *giant plasma membrane vesicles* (GPMVs) sollte hierfür als Grundlage verwendet werden, wobei dies für MDCK II Zellen etabliert werden musste. Die erhobenen Daten sollten einerseits mit konventioneller und hochauflösender Mikroskopie veranschaulicht werden und mit schnellen, reproduzierbaren Methoden ausgewertet werden.

Endosomale Kompartimente sind grundlegend an der Sortiermaschinerie beteiligt, da sie den Transport von vielfältigen Cargos bewerkstelligen. Ein Charakteristikum dieser Kompartimente ist die Ansäuerung, wodurch pH-abhängige Prozesse parallel in der Zelle stattfinden können. Inwiefern Galectin-3 sich pH-abhängig gegenüber seinen Liganden verhält, wurde noch nicht untersucht und sollte mit den Erfahrungen aus den oben erwähnten Methoden analysiert werden. Dafür sollte der pH in mehreren Stufen von neutral bis azid gesenkt werden und sowohl die Affinität als auch die Avidität des Proteins als Oligomer spezifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien und Materialien

Tabelle 3-1 Verwendete Chemikalien/Materialien

Chemikalien/Materialien	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Serva, Heidelberg
Cryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster
DEAE-Dextran	Amersham, Piscataway (USA)
Deckgläser (18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Deckgläser (42 mm x 0,17 mm)	P. Saur, Reutlingen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
ECL-Reagenz SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FKS (fötales Kälberserum)	Gibco-Invitrogen, Carlsbad (USA)
G418 (Geneticin)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Galactose	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glucoseoxidase	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glycerol	Merck, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
HPTLC Silica gel 60	Merck, Darmstadt
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Kaliumcarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Lactose	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Lipofectamin2000	Invitrogen , Carlsbad (USA)
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Fischer Chemical, Wan Chai (Hong Kong)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsstandard für Agarosegele	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Molekulargewichtsstandard für SDS-PA-Gele PageRuler	Fermentas, St. Leon-Rot
Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	MP Biomedicals, Eschwege
Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
NEM (N-Ethylmaleinimid)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Nitrocellulose-Membran Protran	Schleicher & Schüll, Dassel
Nitrocellulose-Membran Sphingo Strips	Echelon Biosciences, Salt Lake City (USA)
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo (Norwegen)
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner, Kremsmünster (Österreich)
PSG (Penicillin, Streptomycin, Glutamin)	PAA, Pasching (Österreich)
Quick-Load 100bp und 1kb DNA-ladder	NEB, Ipswich (USA)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Spritzen, Kanülen	Sarstedt, Nürnberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris (Tris (hydroxymethyl) aminoethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA, Pasching (Österreich)
Tween-20	AppliChem, Gatersleben
Zellkulturmedien MEM / DMEM	PAA, Pasching (Österreich)
Zellkulturplatten	WillCo, Amsterdam (Niederlande) und Sarstedt, Nürnberg
Zeocin	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Tabelle 3-2 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Inkubatoren	
Inkubator für Zellkultur (CO ₂ -begast), Galaxy B	New BrunswickScientific, Edison (USA)
Inkubator für Bakterienkultur	Memmert, Schwabach
<i>Schüttelinkubator für Bakterienkultur innova 4300</i>	<i>New Brunswick Scientific, Edison (USA)</i>
Sterilbänke	
Sterilbank für Bakterienkultur Faster BHA-48	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sterilbank für Zellkultur HeraSafe	Kendro, Langenselbold
Zentrifugen	
Allegra X-22R	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Kühlzentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Kühlzentrifuge BioFuge fresco	Heraeus, Hanau
Rotofix 32X	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge BioFuge pico	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifugen	
Combi Plus	Sorvall-Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Optima LE-80K	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Optima TL	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Rotoren	
JA 12	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
JA 25.50	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
JLA 8.1000	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
JLA 16.250	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
SW-41	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
TLS-55	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Heizgeräte	
Heizblock MB-102	Bioer, Hangzhou (China)
Heizblock UBD	Grant, Wiltshire (UK)
Kontrollgerät Tempcontrol 37-2 digital (für Mikroskop DMI6000B)	Leica Microsystems, Wetzlar
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	
Schüttler KS10	Edmund Bühler, Tübingen

Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Kelheim
PCR-Geräte	
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
SDS-Gelelektrophorese	
Elektrophoresekammer Mighty Small II	Hoefer, San Francisco (USA)
Elektrophoresekammer miniVE	Hoefer, San Francisco (USA)
Elektrophoresekammer SE600 Ruby	Hoefer, San Francisco (USA)
Gießvorrichtung	Hoefer, San Francisco (USA)
Netzgerät EPS 301	Amersham, Piscataway (USA)
Netzgerät EPS 501	Amersham, Piscataway (USA)
Netzgerät PowerPac Basic	Biorad, Hercules (USA)
Platten, <i>Spacer</i> , Kämme	Hoefer, San Francisco (USA)
Agarose-Gelelektrophorese	
Gießvorrichtung, Elektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen
Netzgerät PowerPac Basic	Biorad, Hercules (USA)
Mikroskope	
DMI6000 B mit SR GSD	Leica Microsystems, Wetzlar
Elektronenmikroskop EM 109	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Inverses Epifluoreszenzmikroskop DMI6000B, zusätzlich ausgestattet mit Leica AM TIRF MC Modul	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) TCS SP2 montiert auf Stativ DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
Sonstige optische Geräte	
CD-Spektrometer J-815	Jasco, Easton (USA)
Chemilux-Imager	Intas, Göttingen
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD, Franklin Lakes (USA)
Gelscanner GS800 Calibrated Densitometer	Biorad, Hercules (USA)
Multiplattenlesegerät M200, 200 Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
PHERAS ⁺ Plus	BMG Labtech, Ortenberg
Spektralphotometer Specord S300 UV VIS	Analytik Jena, Jena
Zetasizer Nano Range	Malvern, Herrenberg
Sonstige Geräte	
Analysewaage SBC 22	ScalTec Instrument, Göttingen

CyberScan pH 510	Eutech Instruments, Nijkerk (Niederlande)
Gradientenmischer Econo Gradient Pump	Biorad, Hercules (USA)
Präzisionswaage SI-114	Denver Instrument, Göttingen
Reinstwasser-System Clear	SG Wasseraufbereitung und Regeneration, Hamburg
Ultraschallgerät Labsonic U	B. Braun, Melsungen
Software	
Clone Manager 7	Scientific & Educational Software, Cary (USA)
Evernote	Evernote Cooperation, Redwood City (USA)
ImageJ 1.46r	Wayne Rasband, NIH (USA)
InDesign CS6	Adobe, San Jose (USA)
LabImage	Intas, Göttingen
LAS AF 2.3.5	Leica Microsystems, Wetzlar
Office 2007 / 2010	Microsoft, Redmond (USA)
Photoshop CS5	Adobe, San Jose (USA)
Prism5	GraphPad, La Jolla (USA)
Pymol 1.2r1	Delano Scientific LLC., San Carlos (USA)
Volocity 5	Improvision, Lexington (USA)
Zetazizer Software 6.34	Malvern, Herrenberg

Tabelle 3-3 Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	mk/pk	Hersteller	Verdünnng
Erstantikörper					
Aktin	Ab-5	Maus	mk	BD	1:200
E-Cadherin	36	Maus	mk	BD	1:300
Galectin-3	169	Kaninchen	pk	Prof. Elsässer, Marburg	1:400
GAPDH	1D4	Maus	mk	Enzo	1:285
GP114	-	Kaninchen	pk	Prof. Le Bivic, Marseille (Frankreich)	1:4000
O4 Sulfatid	81	Maus	mk	Millipore	1:125
Rab11	47	Maus	mk	BD	1:500
Tubulin	DM1A	Maus	mk	Sigma-Aldrich	1:500
Zweitantikörper					
Kaninchen-IgG	-	Ziege	pk	Biorad, Hercules (USA)	1:2000
Maus-IgG	-	Ziege	pk	Biorad, Hercules (USA)	1:2000

Tabelle 3-4 Verwendete fluoreszierende Lipide

Lipid	Raft Assoziation	Hersteller	Konzentration (μM)
Naphthopyrene	Liquid ordered	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	151
OregonGreenPE	keine Assoziation	Invitrogen, Carlsbad (USA)	6
RH-DOPE	Liquid disordered	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)	5

3.2 Lösungen und Puffer

Agarosegele

1 % Agarose

in TAE- Puffer

Blockreagenz

5 % Milchpulver

in PBS

Coomassie-Entfärber

25 % Isopropanol

10 % Essigsäure

Coomassie-Färbelösung

0,1 % Coomassie Brilliant-Blue R250

25 % Isopropanol

10 % Essigsäure

GPMV-Puffer

2 mM CaCl_2

10 mM Hepes

150 mM NaCl

GSDIM-Puffer

PBS zusätzlich mit

10 % Glucose (w/v)

4 μM Glucoseoxidase

40 $\mu\text{g/mL}$ Katalase

100 mM Cysteamine (MEA)

pH 7,4

Lämmli (3x)

6 % SDS

30 %	Glycerin
150 mM	Tris
0,03 %	Bromphenolblau
150 mM	DTT

LB-Agar

1 %	NaCl
1 %	Bacto-Trypton
0,5 %	Bacto-Yeast Extract
1,5 %	Agar-Agar

LB-Medium

1 %	NaCl
1 %	Bacto-Trypton
0,5 %	Bacto-Yeast Extract

pH 7,0 (mit NaOH)

Lösung 1 für Plasmidisolierung

50 mM	Glucose
10 mM	EDTA
25 mM	Tris

pH 8,0 (mit NaOH)

Lösung 2 für Plasmidisolierung

200 mM	NaOH
1 %	SDS

Lösung 3 für Plasmidisolierung

3 M	Kaliumacetat(CH ₃ COOK)
1,8 M	Ameisensäure

PBS-Puffer

140 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
6,5 mM	Na ₂ PO ₄
1,5 mM	K ₂ HPO ₄

pH 7,35

PBS(++)-Puffer

PBS zusätzlich mit

1 mM	CaCl ₂
------	-------------------

1 mM MgCl₂

ME-PBS-Puffer

PBS zusätzlich mit

2 mM EDTA

4 mM Mercaptoethanol

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris

190 mM Glycin

0,1 % SDS

SLB-Puffer

25 mM Hepes

150 mM NaCl

pH 7.25

SOC-Medium

2 % Bacto-Tryptone

0,5 % Bacto-*Yeast Extract*

10 mM NaCl

20 mM MgSO₄

20 mM Glucose

TAE-Puffer

40 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8,0 (mit Essigsäure)

TE-Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8,0 (mit HCl)

Transferpuffer für Western Blot

25 mM Tris

190 mM Glycin

20 % MetOH

3.3 Modellmembranen zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen

Der Nachweis von Interaktionen zwischen Zellen und einem gezielten Protein kann genutzt werden, um bspw. eine Lokalisation des Proteins in der Nähe der Plasmamembran oder des Zytosols zu identifizieren. Ebenfalls können mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Interaktionen zwischen Proteinen detektiert werden. Versucht man dies allerdings zu quantifizieren bzw. Bindungskonstanten zu errechnen oder Spezifitäten genauer zu analysieren, erschwert das Zellmodell durch falsch-positive Ergebnisse die Dateninterpretation. U.a. wurden aus diesen Gründen andere Modelle gesucht, die die Visualisierung von Interaktionen vereinfachen, die Durchsatzrate zur Quantifizierung erhöhen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessern. Es wurden daher unterschiedliche Modellmembranen entwickelt, die die Zelle unter verschiedenen Aspekten nachahmen soll. Zur Vereinfachung werden die in dieser Arbeit erklärten Modelle in die Gruppen „aus Zellen stammende Lipidmembranen“ (native Membranen) und „synthetisierte Lipidmembranen“ eingeteilt.

Die Vorteile bei der Verwendung von synthetisierten Lipidmembranen liegen in der spezifischen Definition der Lipidkonzentration und -zusammensetzung, der hohen Reproduzierbarkeit durch homogene Vesikelpopulationen und der Stabilität während der Versuchsdurchführung. Im Gegensatz dazu beinhalten aus Zellen stammende Lipidmembranen eine Zell-ähnliche Protein- und Lipidkomposition, die selbst unter hohem Aufwand nur annähernd synthetisierbar wäre. Bspw. können mit diesem Modell Interaktionen zu komplexen Glykanen oder das Verhalten von Lipiden in einer Zell-ähnlichen Umgebung erfasst werden. Ebenfalls kann durch gezielte Induktion von Lipiden, Glycosidasen oder Chemikalien ein komplexes Ereignis genauer spezifiziert werden.

3.3.1 Synthetisierte Lipidmembranen

3.3.1.1 Synthese von *Large unilamellar vesicles* (LUV)

Große unilamellare Vesikel werden aus Lipiden bekannter Konzentration und meist auch bekannter Komposition synthetisiert. Sie haben in der Regel eine Größe zwischen 100 - 200 nm oder größer (< 1.000 nm). Dies kann im Rahmen der Synthese selbst bestimmt werden. Die Lipide werden hierfür in Chloroform oder in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (2:1) gelöst (Lipidkonzentrationen 1 mg/mL) und entsprechend ihrer molaren Masse prozentual gemischt. Als Hauptbestandteil jeder Synthese wurden Phosphatidylcholine gewählt, die sich

durch Länge der Acylreste und deren Sättigung unterschieden. Hinzu kamen Cholesterol und Sphingomyelin, die zusammen die Plasmamembran einer Zelle darstellen sollten.

Die Synthese begann mit der Verdunstung des Lipidgemischs unter Bedampfung mit Stickstoffgas, um einen gleichmäßigen Lipidfilm am Behälterboden zu erreichen. Dabei wurde der Behälter entsprechend gedreht, so dass ein möglichst dünner Film entstand. Um alle Lösungsmittelreste zu beseitigen, wurde die Probe für 12 - 24 h unter Vakuum gesetzt. Dies passierte entweder unter einer entsprechenden Glasglocke oder in einer Ultrazentrifuge, aus der die Luft maschinell gezogen wurde. Das Lösen des Lipidfilms in dem so genannten *supported lipid bilayer* (SLB)-Puffer (s. 3.2) erfolgte schüttelnd über eine Stunde bei entsprechender Schmelztemperatur des Lipids, das den höchsten Schmelzpunkt besaß. Das Gemisch wurde milchig trüb, was auf einer Bildung von multilamellaren Vesikeln beruht, sprich Vesikel, die ähnlich einer Zwiebel aus mehreren Lipiddoppelschichten bestehen. Darauf folgend wurde zehnmal alternierend die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei entsprechendem Schmelzpunkt wieder aufgetaut. Um eine homogene Größe und unilamellare Vesikel zu bekommen, wurde die Methode der Extrusion verwendet, bei der das Gemisch 11x durch eine Polykarbonatmembran gepresst wurde, dessen Porengröße durch den eingesetzten Filter genau definiert war. In allen Versuchen wurden 100 nm große Vesikel synthetisiert. Zur Erläuterung des Aufbaus eines Extruders siehe Abbildung 3-1. Das Gerät wurde vor Benutzung mit Puffer durchspült.

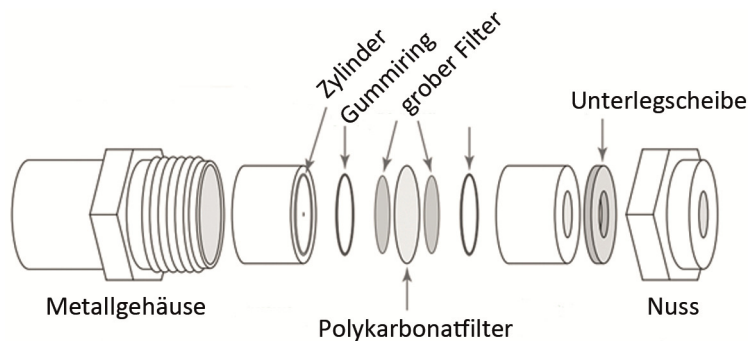


Abbildung 3-1 Aufbau eines Lipid-Extruders der Firma Avanti Polar Lipids (modifiziert)

Dargestellt ist der schematische Aufbau eines Lipid-Extruders (Avanti Polar Lipids). Die Lipide werden mit hohem Druck durch eine Polykarbonatmembran gepresst, die von zwei aus Teflon bestehenden Zylindern zusammengehalten wird. Dazwischen liegen zwei Gummiringe, die das System abdichten. Zwei weitere gröbere Membranen filtern um die Polykarbonatmembran Aggregate aus dem Lipidgemisch. Umgeben ist das Gerät von einem Metallgehäuse, dass mit einer Nuss verschlossen wird.

Nach dieser Prozedur zeichneten sich die Vesikel durch ihre Stabilität und eine lange Halbwertszeit von mehreren Wochen aus, was durch Flotation nach einer Zentrifugation bei 50.000 x g auf einem NycoDenz-Gradienten für eine Stunde kontrolliert wurde, da geschlossene und unilamellare Vesikel eine andere Dichte als Bruchstücke von Membranen besitzen.

3.3.1.2 Lipid monolayer assay (LMA)

Bei dieser Methode wird die Veränderung der Oberflächenspannung eines Lipidfilms nach Zugabe eines möglichen Bindepartners, in diesem Fall ein Protein, gemessen. Dabei wird ein einschichtiger Lipidfilm auf einer Wasseroberfläche gebildet, in der über einer Feder ein Blatt Papier hängt, dessen Auslenkung mittels eines Piezzokristalls gemessen werden kann. Die Kraftänderung wird gemessen in Millinewton (mN) pro Meter (m), wobei geringe Schwankungen detektiert werden können. Durch diese Eigenschaft kann die Methode dazu verwendet werden, um Protein-Lipid-Interaktionen zu veranschaulichen. Der Lipidkopf zeigt dabei Richtung Wasser und der Acylschwanz in Richtung Luft.

Zu Beginn wurde das System äquillibriert, in dem ein Bassin mit entsprechendem Puffer gefüllt und das Blatt Papier an der Feder zu einem Drittel hineingehängt wurde. Daraufhin wurden 15 µL der gewünschten Lipide (in Chloroform, Konzentration 0,5 mg/mL) auf die Pufferoberfläche dazupipettiert und wieder bis zur Äquilibration gewartet. Hierbei zeigte sich, dass eine Kraftänderung bis zu zehn Millinewton durch die Zugabe der Lipidmischung entstehen konnte. Es folgte die Zugabe des Proteins Galectin-3 (0,5 µM) und die Messung der Kraftänderung über der Zeit.

3.3.2 Aus Zellen-stammende Lipidmembranen

3.3.2.1 Isolation von Giant plasma membrane vesicles (GPMVs)

Bei diesem Modellsystem handelt es sich um Vesikel der zellulären Plasmamembran, die durch Induktion mit einer hohen Konzentration an Calcium und eines Reduktionsmittels isoliert werden. Die Vesikel sind zwischen 1 und 30 µm groß und können mit entsprechenden Fluorophoren unter einem Epifluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dieses Modell hat den Vorteil, dass es zum einen aus einer nahezu physiologischen Membranzusammensetzung an Proteinen und Lipiden besteht und gleichzeitig die Visualisierung mit Fluorophoren schnell und leicht durchzuführen ist (Baumgart *et al.*, 2007).

Die Bildung der Vesikel wurde mit 5 - 7 Tage kultivierten MDCK II Zellen durchgeführt. Dabei wurden, falls nicht anders deklariert, die Zellen mit 4 mM NEM in dem GPMV-Puffer (s. 3.2) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach positiver Identifizierung von Vesikeln unter einem Lichtmikroskop wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß pipettiert und die Menge und Reinheit der GPMVs nochmals unter demselben Mikroskop kontrolliert. Falls eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchgeführt wurde, wurden 50 µL der Vesikel auf eine Glasschale pipettiert, die für das entsprechende Mikroskop geeignet war. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die Vesikel mit Proteinen inkubiert und zweimal bei 4.000 rpm für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dabei bis auf wenige Mikroliter abgenommen und das Pellet in GPMV-Puffer ohne Zusätze aufgenommen.

3.4 Aufreinigung

3.4.1 Proteinaufreinigung

Zur Durchführung von Bindungsstudien und von Zellexperimenten wurde das rekombinante Protein Galectin-3 und unterschiedliche Galectin-3-Mutanten mit hohem Reinheitsgrad aufgereinigt. Dieses geschah nicht über eine *tag*-basierte Affinitätsisolation, sondern über die Fähigkeit des Proteins Lactose zu binden. Dieser Zucker war kovalent mit einer Kugel verbunden, die leicht mittels Zentrifugation vom Lysat getrennt werden konnte. Der Vorteil dieser Methode war, dass nur solches Protein isoliert wurde, welches auch seiner physiologischen Eigenschaft gleich zuckerbindungsfähig war.

Die Expression des Proteins wurde in *E. coli* Bakterien (BL 21 DE3) durchgeführt, welche zuvor mit dem Zielgen in dem Vektor pET3c transformiert wurden. Das Plasmid enthielt eine Promoterstelle für die T7 RNA Polymerase, welche zuvor mittels des DE3 Prophagen ins Genom des Bakteriums integriert wurde. Die Expression unterstand dabei der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters, dessen Induktion über IPTG erfolgte, welches als Lactosederivat diente und nicht metabolisierbar war, so dass eine konstitutiv aktive Expression stattfinden konnte.

Die transformierten Bakterien wurden in 50 mL LB-Medium (s. 3.2) über Nacht angezogen und bis zu einer optischen Dichte (OD 600 nm) von 0,5 in 1 L LB-Medium weiter kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt, in dem die Bakterien im maximalen exponentiellen Wachstum waren, erfolgte die Induktion mittels IPTG (0,5 mM) über 3-4 Stunden bei 37 °C. Die Kultur wurde daraufhin bei 4.000 rpm für 10 min pelletiert und in ME-PBS (s. 3.2) resuspendiert, welches Proteinaseinhibitoren enthielt (1/2 Tablette / 25 mL ME-PBS). Nach Homogenisierung mittels einer Spritze wurden die Zellen in einem *liquidizer* aufgeschlossen und für 15 min bei 8.000

rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde steril filtriert und 10 mL wurden dann mit 1 mL Lactosekugeln über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit ME-PBS für 10 min, wonach das gebundene Protein mit 150 mM Lactose eluiert wurde. Um das Protein von der nun gebundenen Laktose zu befreien, wurde es eingengt und über eine Größenausschlusschromatographiesäule (s. 3.5.7) aufgetrennt. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Menge an Protein bei OD 280 nm bestimmt.

3.4.2 Lipid-Extraktion

Zur Identifizierung des Lipidoms der MDCK II Zelllinie, die für diese Arbeit vermehrt verwendet wurde, wurde die Methode der Lipid-Extraktion nach Folch verwendet, die durch Gregson und Sampaio modifiziert wurde (FOLCH *et al.*, 1957, Gregson 1993, Sampaio *et al.*, 2011). Nach Isolation kann das Lipidom mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (s. 3.5.6) analysiert werden.

Zur Vorbereitung wurden polarisierte MDCK II Zellen in PBS von einer Zellkulturplatte geschabt und bei 1.500 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS mit 0,8 % Kaliumchlorid resuspendiert. Es folgte eine Aufschließung der Zellen mittels einer Kanüle, durch die das Zelllysate 15 Mal gepresst wurde. Die Lipid-Extraktion begann nun mit der Zugabe von der Extraktionslösung (2:1 Chloroform/Methanol), die im Verhältnis Zelllysate:Extraktionslösung 1:20 hinzugegeben wurde. Diese Mischung wurde für mindestens zwei bis maximal 12 h auf 4 °C in einem Scheidetrichter mit Teflonklemme inkubiert. Danach wurde die untere Phase abgenommen und in einem Rotationsvaporisator bis zur Trockenheit evaporisiert. Es entstand ein weißer Film am Boden des Extraktionsgefäßes, welcher in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst wurde. Das Lipidlysate wurde bis zur weiteren Verwendung in einem Lösungsmittel-geeignetem Reaktionsgefäß bei - 20 °C aufbewahrt.

3.5 Spektroskopie / Chromatographie

3.5.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Messmethode, bei der Partikel bis zu einer minimalen Größe von 0,5 µm analysiert werden können. Gemessen werden können hierbei drei Parameter, die Aufschluss über Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität geben. Technisch wird dafür mittels eines Überdrucks eine Probe mit definierter Geschwindigkeit in eine Röhre gesogen, so dass ein laminärer Fluss entsteht, bei der die Partikel aufgetrennt werden und nacheinander an einem Detektor vorbeifließen, der die einzelnen Parameter registrieren kann. Dies kann in kurzer Zeit mit einer hohen Anzahl an Messereignissen

erfolgen. Deswegen eignet sich dieses Verfahren zur Analyse von Zellen und großen Membranvesikeln, um beispielsweise Interaktionsstudien von fluoreszenzmarkierten Proteinen durchführen zu können.

Zur Messung von GPMVs wurden diese zuvor aus der zu untersuchenden Zelllinie isoliert (s. 3.3.2.1) und von Zelldebris durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (3 min bei 800 rpm) befreit. Die Anzahl an Vesikeln wurde unter einem Lichtmikroskop mit 20facher Vergrößerung bestimmt und bei geringer Zahl (5 - 20 Vesikel/Blickfeld) wurde die Probe bei 3.000 rpm für 10 min aufkonzentriert. Es zeigte sich hierbei, dass die Menge von Vesikeln einer 24fach geschachteten Zellkulturplatte ausreichte, um eine Messung mit 20.000 Ereignissen für die Auswertung im Durchflusszytometer zu erlangen. Für Interaktionsstudien wurden 250 µL der Vesikel mit einem fluoreszenzmarkierten Protein (Galectin-3-Alexa647) mit entsprechender Konzentration für 30 min inkubiert und es folgten zwei Waschschrte (4 min bei 2.000 rpm), die nicht gebundenes Protein entfernen sollten. Die Vesikel konnten nun für die Durchflusszytometrie verwendet werden, wobei darauf geachtet wurde, dass 10.000 bis 20.000 Ereignisse gemessen wurden. Im Fall der Interaktion zwischen einem Zielprotein und einem Vesikel wurde eine unbehandelte Kontrollpopulation mitgeführt, dessen Einstellungen für die Größe und Granularität der Hauptpopulation während der Messung nicht geändert wurde.

3.5.2 Fluoreszenzpolarisation (FP)

Die meisten der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, die mit FP durchgeführt wurden, entstanden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Hakon Leffler (Universität Lund, Schweden). Weiterhin wurden alle FP-Experimente zusammen mit Tamara Straube durchgeführt.

Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Analyse ist die Fähigkeit eines Fluorophors linear polarisiertes Licht nach Absorption wieder zu emittieren. Bewegt sich dieses Teilchen, wird die Polarisation entsprechend der Geschwindigkeit verändert. Diese Abweichung wird von zwei Detektoren, die perpendicular zueinander stehen, gemessen, wobei die Differenz der Intensitäten der beiden Detektoren als Maß für den Grad der Polarisation angesehen wird. Wird die Geschwindigkeit des Fluorophors durch Bindung an ein Protein verlangsamt, wird die Differenz der gemessenen Intensitäten größer, die Polarisation steigt. Mit diesen Eigenschaften konnten Bindungskurven errechnet und kompetitive Inhibitionsexperimente mit Galectin-3 und einem entsprechenden Zuckerliganden durchgeführt werden. Die Messung erfolgte innerhalb weniger Sekunden und mit einer 96fach geschachteten schwarzen

Kunststoffplatte. Durchgeführt wurden alle Messungen in zwei- bis dreifacher Ausführung, wobei sowohl Galectin-3 als auch bei kompetitiven Experimenten der Inhibitor titriert wurden. Als Kontrollen wurden bei jedem Durchgang sowohl das Fluorophor alleine als auch das Fluorophor gebunden an den Liganden mitgemessen und auf diese Werte relativiert. Im Fall von pH-Messungen wurden auf diese beiden Kontrollen in dem entsprechenden pH-Puffer relativiert.

3.5.3 CD-Spektroskopie

Diese Messmethode dient zur Analyse der Sekundärstruktur eines Proteins. Hierbei wird die Eigenschaft eines chiralen Moleküls genutzt, sprich eines, das als Enantiomer vorliegt, zirkular-polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Es wird dabei in Abhängigkeit der Wellenlänge ein Spektrum gemessen, wobei ein rein α -helikales Protein ein anderes Spektrum aufweist als ein Protein mit einem hohen Anteil an β -Faltblättern. Die gemessenen Daten können mit Datenbanken ähnlicher spektraler Proteine abgeglichen werden, um Rückschlüsse auf die sekundäre Struktur des Proteins zu erhalten. Ebenfalls können Strukturänderungen aufgezeichnet werden.

Für die Untersuchung wurde eine dünne Glasküvette (1 mm Zelllänge) mit 300 μ L Füllvolumen verwendet. Es wurden dabei mindestens 200 μ L eingesetzt, um im Messbereich arbeiten zu können. Es zeigte sich, dass eine Proteinkonzentration zwischen 0,1 - 0,3 mg/mL ein ausreichend starkes Signal erbrachte und gleichzeitig die Absorption nicht über den Wert von 4 steigen ließ. Das Spektrum wurde im Bereich zwischen 195 - 250 nm erfasst und jede Messung wurde dreimal wiederholt. Die Abtastgeschwindigkeit betrug 50 nm/Minute und die Temperatur war konstant bei 20 °C. Als negative Kontrolle wurde der reine Puffer, in dem sich das Protein befand, ebenfalls analysiert, um falsch-positive Effekte zu vermeiden.

3.5.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mit dieser Technik können Größen und Größenverteilungen von Partikeln in Lösung im Submikrometerbereich gemessen werden. Die Technik ist nicht invasiv und kann mit geringen Proteinkonzentrationen durchgeführt werden. Dazu wird ein monochromatischer Laser auf eine zu untersuchende Probe gestrahlt, dessen Streulicht über einen Detektor aufgefangen wird. Dieses Streulicht interferiert und enthält unterschiedliche Intensitäten, die abhängig zum Abstand der in der Lösung befindlichen Makromoleküle sind. Wird die Messung über einen gewissen Zeitraum durchgeführt, kann man Rückschlüsse auf die Bewegung der Makromoleküle ziehen und daraus den Diffusionskoeffizienten ermitteln. Mit Hilfe dessen kann über die Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius berechnet werden.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

D = Diffusionskoeffizient

k = Boltzmannkonstante

T = absolute Temperatur

π = Pi

η = dynamische Viskosität des Lösungsmittels

r = Partikelradius

Formel 3-1 Berechnung des Diffusionskoeffizienten

In dieser Arbeit wurde die Technik für Größenmessungen von Galectin-3 als Mono- und Oligomer verwendet. Dazu wurde zu einer konstanten Galectin-3-Konzentration (100 μ M) Asialofetuin oder der Zucker Lacto-N-neohexaose (LNnH) titriert und durch drei Messungen die Größe der in der Lösung befindlichen Partikel gemittelt.

3.5.5 Turbiditätsassay

Galectin-3 besitzt als einziges chimäres Protein der Galectin-Familie die Fähigkeit zu oligomerisieren. Während der Komplexierung entstehen derart große Cluster, dass eine Trübung der Lösung entsteht, die bei 350 nm detektierbar ist. Diese Messungen wurden mit dem Liganden Asialofetuin (ASF) durchgeführt, an das Galectin-3 theoretisch bis zu achtmal binden kann.

Zur Erhebung der Daten wurde Protein verwendet, das maximal 7 Tage auf 4 °C nach Aufreinigung gelagert wurde. Die Messungen wurden mit Titrationsreihen und drei Wiederholungen durchgeführt, wofür eine 96fach geschachtelte Plexiglasplatte verwendet wurde.

3.5.6 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Auftrennung von Lipiden wurde die Dünnschichtchromatographie verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Methode, bei der über hohe Kapillarkräfte Substanzen in einer Lösung anhand ihrer Polarität aufgetrennt werden. Zumeist wird dabei Kieselgel (stationäre Phase) beschichtet auf einer Glasplatte verwendet, das am unteren Rand mit dem Analyt beschichtet wird und danach in ein Lösungsmittel gestellt wird, um die Auftrennung zu starten. Das Kieselgel ist porös und enthält an der Oberfläche polare Si-OH-Gruppen, durch die die

unterschiedlich stark polarisierten Substanzen vorbeilaufen und adsorbiert werden. Hierbei ist die Wahl des Lösungsmittels entscheidend, da Stoffe zu schnell oder zu langsam durch das Kieselgel ziehen können. Daher muss zuvor ein Lösungsmittel gewählt werden, das der Polarität der aufzutrennenden Substanzen ähnlich ist. Eine spezielle Form der Dünnschichtchromatographie ist die *high performance* DC, durch die man eine breitere Auflösung als auch eine bessere quantitative Aussage über das Analyt bekommt. Ebenfalls ist in einer erweiterten Anwendung eine 2D-DC möglich, bei der nach dem ersten Lauf die Platte um 90 °C gedreht mit einem anderen Lösungsmittel behandelt werden kann.

Zu Beginn wurde die Platte vorsichtig mit einem Bleistift 1,5 cm vom unteren Rand entfernt mit einem Strich von links nach rechts markiert. Es folgte die Beladung der zu untersuchenden Lipide. Bei bekannter Konzentration wurden 5 - 10 µL (1 mg/mL) aufgetragen. War die Konzentration nicht bekannt, wurde eine Titrationsreihe verwendet. Die Auftrennung erfolgte dabei in folgendem Puffer: Isopropanol/Methanol/0,2% CaCl₂ (40/7/20 vol%).

3.5.7 Größenausschlusschromatographie

Diese Methode ermöglicht die Trennung von hoch- und niedrigmolekularen Substanzen mit Hilfe einer Matrix. Diese Matrix besteht aus porösen Polymeren, von der die Substanzen abhängig von ihrer Größe bzw. ihrer Ausdehnung im Raum unterschiedlich stark zurückgehalten werden. Somit diffundieren kleine Moleküle langsamer durch die Matrix als große Makromoleküle. Zucker oder Salze werden dadurch von Proteinen getrennt. Hierbei ist die Diffusionsgeschwindigkeit proportional zu dem Logarithmus der molekularen Masse, wodurch die Größe des Moleküls abgeschätzt werden kann.

Zur Trennung von Lactose von Galectin-3 wurden PD-10 Entsalzungssäulen mit Sephadex G-25 Medium (*GE Healthcare*) verwendet. Diese erlaubten die Trennung von hochmolekularen Substanzen über 5.000 Dalton und wurden zu Beginn mit dem 20fachen ihres Ausschlussvolumens in einem selbst definierten Puffer äquilibriert. Danach erfolgte die Beladung der Säule mit der zu untersuchenden Substanz in 1 bis maximal 2,5 mL Volumen. Die Elution erfolgte mit 3,5 mL. Dieser Vorgang wurde nach Konzentrierung des Proteins wiederholt, wobei die Säule nach Waschen mehrmals verwendet wurde.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Galectin-3 wurde der *ÄKTA™purifier 10 System* (*GE Healthcare*) verwendet. Dafür wurden alle eingesetzten Puffer zuvor steril filtriert. Die Säule war eine Superdex 200 10/300 GL, die Substanzen zwischen 10.000 und 600.000 Dalton separieren konnte und nach Herstellerangaben eingesetzt wurde. Kalibriert wurde die Säule

mit dem Protein Anhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Albumin (66 kDa) (durchgeführt von Holger Webert).

3.5.8 *Sodiumdodecylsulfate*-Polyacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können anhand ihres Molekulargewichts in einem Acrylamidgel aufgetrennt werden, dazu nutzt man die Eigenschaften des Detergenz *Sodiumdodecylsulfate* (SDS), welches mit dem Protein interagiert und anhand der eigenen starken negativen Ladung polarisiert. Dabei ist die Eigenladung des Proteins zu vernachlässigen und die Auftrennung ist allein abhängig von der Größe des Proteins. Zusätzlich wird mit hoher Temperatur die Faltung und mittels eines Reduktans Disulfidbrücken im Protein zerstört, so dass es linearisiert vorliegt. In Abhängigkeit der Prozentigkeit des polymerisierten Geles kann der Auftrennungsbereich variiert werden. Um große Proteine aufzutrennen, werden niedrig-prozentige Gele verwendet und höher-prozentige Gele eignen sich für kleinere Proteine. Daher kann diese Methode für Proteine von 5 bis 250 Kilodalton Größe verwendet werden. Um das Proteinlysate auf einen Punkt im Gel zu fokussieren, so dass alle Proteine zur gleichen Zeit aufgetrennt werden können, besteht das Gel aus zwei Bereichen. Im oberen Teil erfolgt die Fokussierung (Sammelgel) und im unteren die Trennung (Trenngel). Erreicht wird dies durch einen geringeren Anteil an Acrylamid und durch eine pH-neutrale Umgebung, durch die die Proteine laufen müssen, wohingegen im Trenngel der pH-Wert basisch ist.

Tabelle 3-5 Pipettiervolumen zur Herstellung von zwei SDS-Gelen

	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
Komponente				
dH ₂ O	6,15 mL	4,95 mL	3,45 mL	3,9 mL
Acrylamid (30%)	5,15 mL	6,0 mL	7,5 mL	1 mL
Tris 1,5 M (pH 8,8)	3,85 mL	3,85 mL	3,85 mL	
Tris 1 M (pH 6.8)				725 µL
SDS (20%)	77,5 µL	77,5 µL	77,5 µL	28,75 µL
APS (10%)	155 µL	155 µL	155 µL	57,5 µL
TEMED	11,5 µL	11,5 µL	11,5 µL	5,75 µL

Es wurden 10-15-prozentige Gele nach Sambrook *et al.*, 2001 hergestellt. Die Proteine wurden zuvor in Laemmli Puffer aufgenommen (Laemmli 1970, s. 3.2) und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Beladung des Gels erfolgte mit einer Hamiltonspritze, wobei darauf geachtet wurde, dass

die gleichen Volumina eingesetzt wurden, um einen gleichmäßigen Lauf zu verwirklichen. Die Proben liefen bei 80 V in das Gel für ca. 30 min bis sie sich an der Grenze zum Trenngel sammelten. Danach wurde der Lauf mit 180 - 200 V weitergeführt bis die Laemmli-Laufbande den unteren Teil des Gels erreichte oder komplett hinausgelaufen war. Das SDS-Gel stand nun bereit für Proteinmarkierungstechniken (s. 3.7) oder für das Immunoblot-Verfahren (s. 3.10.1).

3.5.9 Native Gelelektrophorese

Im Gegensatz zur SDS-PAGE, bei der das Protein entfaltet und mit stark negativ geladenen SDS-Molekülen verknüpft wird, werden bei der nativen Gelelektrophorese die Proteine in ihrer nativen Konformation aufgetrennt. Dies hat den Vorteil, dass auch Oligomere des Proteins dargestellt werden können.

Die Herstellung des nativen Gels erfolgt gleich der SDS-Gel-Herstellung, es wurde allerdings kein SDS verwendet. Ebenfalls wurden die Gele mindestens einen Tag vor Gebrauch bei 4 °C gelagert, was den Einlauf der nativen Proteine vom Sammel- zum Trenngel verbesserte.

3.5.10 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinlysaten wurde die Methode nach Lowry angewandt (Lowry *et al.*, 1951). Sie beruht auf einem Thiol-abhängigen Farbumschlag, der bei 750 nm detektiert werden kann. Hierfür wurden drei Lösungen A, B und S der Firma Bio-Rad (*DC Protein Assay Kit*) verwendet, wobei Lösung A im Verhältnis 50:1 mit Lösung S vermischt wurde. Dann wurden 5 µL des Proteinlysats mit 20 µL der Lösung A-S gemischt und in 200 µL von Lösung B aufgenommen. Die Messung der Absorption erfolgte zusammen mit einer Standardkurve mit Albumin von 0,4 - 2,4 mg/mL. Der Farbumschlag reichte von hellgrün (geringe Proteinkonzentration) bis tief blau-lila (Proteinkonzentration bis zu 2,4 mg/mL).

3.5.11 Proteinbestimmung mittels UV-Spektroskopie

UV-spektroskopische Konzentrationsbestimmungen wurden mit einem Nanodrop 2.000c (*Thermoscientific*) durchgeführt. Dieses Gerät dient zur Konzentrationsbestimmung von reinen Protein-, DNA- oder RNA-Lysaten, weshalb Zelllysate nicht gemessen werden können. Ebenfalls stören Substanzen wie Detergenzien und Reduktionsmittel die Messung.

Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierung mit ddH₂O durchgeführt. Es folgte die Normierung mit dem entsprechenden Puffer, in der das Protein gelöst war. Es wurde zwei bis dreimal gemessen und deren Mittelwert verwendet. Da Proteine bei 280 nm absorbieren und Alexa647 Farbstoffe in einem höheren Bereich (650 nm), konnte diese Methode ebenfalls nach Markierung des Proteins mit einem solchen Farbstoff (s. 3.7.3.1) angewandt werden, um

sowohl die Proteinkonzentration als auch die Menge an Mol Farbstoff zu bestimmen. Das Verhältnis gebundenes Fluorophor/Protein ergab Rückschlüsse auf die Effizienz der Markierung.

3.6 Mikroskopietechniken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für unterschiedliche Fragestellungen gezielte Mikroskopietechniken verwendet. Zur Visualisierung der apikalen Membran von MDCK II Zellen wurde ein Rasterkraftmikroskop verwendet, zur Vermessung der Membrandicken von LUVs und zur Illustrierung von Galectin-3-Clustern in Zellen die Elektronenmikroskopie und für Vesikelanalysen die Konfokale *Laser-Scanning*- und *ground state depletion*-Mikroskopie.

3.6.1 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie nutzt die Wellenlänge von Elektronen, welche abhängig von der angelegten Spannung variiert. So liegt bei einer Spannung von 10 V die Wellenlänge von Elektronen im Nanometerbereich, was weit unterhalb des Möglichen der Lichtmikroskopie ist. Dadurch kann die Elektronenmikroskopie für Auflösungen bis zu 0,1 nm verwendet werden. Es wird dafür ein Elektronenstrahl in einem Vakuum auf das Objekt geleitet und die elastische Streuung des Strahls detektiert. Hierbei muss das Objekt eine gewisse Dichte aufweisen, die durch unterschiedliche Kontrastierungsmethoden verbessert werden kann.

In dieser Arbeit wurden multilamellare Vesikel aufgenommen, um die Qualität und Membrandicken mit unterschiedlicher Lipidkomposition zu bestimmen. Es wurden dafür 15 μ L der Vesikel (1 mg/mL) auf Parafilm pipettiert und für 30 s mit einem Metallnetz (Durchmesser 3,2 mm mit 200 Quadraten) bedeckt. Das Netz wurde daraufhin für weitere 30 s auf 2 % Phospho-Wolframsäure (v/v) gelegt. Nach Trocknung des Präparats über Nacht wurde es mit einem Elektronenmikroskop EM 109 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) untersucht.

3.6.2 Konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie (KLSM)

Im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie, bei der das komplette Objekt gleichmäßig belichtet wird, kann bei der konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie (KLSM) punktförmig angeregt werden. Der Vorteil ergab sich in einem verbesserten Kontrast, da Streustrahlung außerhalb der Fokusebene vermindert wird. Erreicht wird dies durch zwei Lochblenden, wobei die erste zur Fokussierung des Lichtes in einem Punkt des Objektes dient und die zweite das emittierte Licht nur aus einer Fokusebene durchlässt. Die beiden Lochblenden stehen konfokal zueinander, was heißt, dass sie den gleichen Brennpunkt besitzen. Der Benutzer kann die zweite Lochblende verändern (*pinhole*); hierbei gilt, dass eine Reduktion der Lochblende den

Kontrast erhöht, allerdings die Menge an Licht, die vom Detektor erfasst wird, vermindert. Das Objekt wird durch die punktförmige Detektion nacheinander abgerastert, was die Zeit zur Aufnahme eines Bildes erhöht.

Das Bild entstand mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten, wobei je nach Stärke des Hintergrundes jede Abrasterung bis zu 16 Mal wiederholt wurde. Die Scanfrequenz lag bei allen Aufnahmen bei 400 Herz. Zur Anregung im Bereich von 488 nm wurde ein Argonlaser und für den Bereich von 633 nm ein Helium/Neon-Laser verwendet. Detektiert wurde der Emissionsbereich zwischen 495 - 535 nm (Argonlaser) und 640 - 700 nm (HeNe-Laser), was bei dieser Mikroskopiertechnik genau festgelegt werden konnte.

3.6.3 *Ground state depletion* GSD-Mikroskopie

Die GSD-Mikroskopie gehört zur Gruppe der RESOLFT (*reversible saturable optical fluorescence transitions*) Technologieentwicklung, bei der die Auflösungsgrenze nach Abbe von 200 - 250 nm unterboten wird (s. Formel 3-2). Dies wird durch ein stochastisches Anschalten einzelner Fluorophore erreicht, die über eine hochsensitive CCD-Kamera detektiert werden können, wodurch theoretisch die Auflösungsgrenze von der Größe des Fluorophors abhängig ist (Hell S.W. *et al.*, 1995, s. Formel 3-3). Hierbei werden zuerst alle Fluorophore in den Dunkelzustand gebracht, aus dem sie zufällig in den Grundzustand zurückfallen, wobei Photonen emittiert werden (s. Abbildung 3-2). Diese Technik gehört damit zur Gruppe der Lokalisationsmikroskopie, da Signale nicht wie bei der konfokalen Mikroskopie nacheinander abgerastert werden, sondern zufällig im zu betrachtenden Bild lokalisiert aufgenommen werden. Ist ein Fluorophor wieder in den Grundzustand zurückgefallen, kann der Zyklus von neuem beginnen, wodurch eine Blinkfrequenz entsteht, die für jedes Fluorophor individuell ist.

$$A = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Formel 3-2 Beugungsgrenze mit einem Lichtmikroskop nach Abbe

$$A = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}}$$

Formel 3-3 Beugungsgrenze mit einem Lichtmikroskop nach Hell

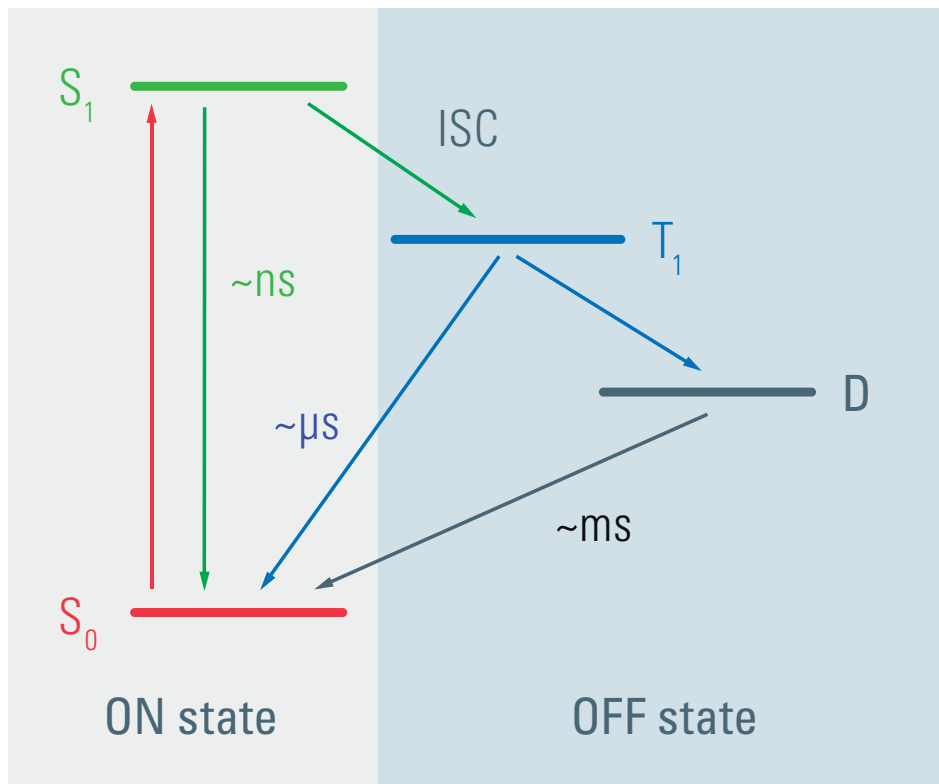


Abbildung 3-2 Jablonski Diagramm

Dargestellt ist die Theorie für die GSD-Mikroskopie. Fluorophore werden von Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_1 durch Exzitation überführt. Von diesem Zustand fällt das Fluorophor in einen Zwischenzustand (*intersystem crossing* (ISC)) und dann wieder zurück in den Grundzustand (wenige Mikrosekunden (μs)), wobei Licht emittiert wird. Wird die Energie des anregenden Lasers drastisch erhöht, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass das Fluorophor nach S_1 nicht zurück in den Grundzustand fällt, sondern vorher in den Dunkelzustand (D) kommt, aus dem es langsam (wenige Millisekunden (ms)) wieder zurückfällt. Dieser Vorgang ist für jedes Fluorophor zeitlich versetzt, so dass die Signale einzeln voneinander unterschieden werden können.

Die Technik wurde zur Visualisierung von GPMVs verwendet, die über Poly-L-Lysin an einen Glasuntergrund beschichtet wurden (s. 3.9.7). Die angehafteten Vesikel wurden mit einem Objektträger eingedeckelt, der mittig eine Einbuchtung mit einem Volumen von ca. 50 μL besaß, wodurch das Milieu des Mediums, in dem sich die Vesikel befanden, länger stabil blieb. Dieses Milieu musste zuvor speziell für jedes Fluorophor entwickelt werden (empirische Arbeiten von Sophie Veitinger, Philipps Universität Marburg und Alexandra Elli, Carl Zeiss AG Oberkochen), welches das Blinkverhalten verbesserte. Für das YFP-Protein wurde ein Gemisch aus MEA, Catalase und Glucoseoxidase verwendet (s. 3.2).

3.6.4 Rasterkraftmikroskopie (*atomic force* Mikroskopie AFM)

Eine weitere Mikroskopiemethode, um die Beugungsbegrenzung nach Abbe zu umgehen, stellt die Rasterkraftmikroskopie dar. Hierbei werden Veränderungen im Objekt wie Größe, Dichte oder Elastizität mit einer Messnadel (*Cantilever*) abgerastert. Der *Cantilever* hängt an einem flexiblen Arm, der bei Kontakt zum Objekt ausgelenkt wird. Diese Auslenkung kann über einen reflektierenden Infrarotlaser, der auf den Rücken des *Cantilevers* projiziert wird, im Nanometerbereich detektiert werden. Die Messung kann mit unterschiedlichen Verfahren erfolgen, wobei der *Cantilever* in direktem Kontakt mit dem Objekt steht, kurz über dem Objekt oder intermittierend mit dem Objekt interagiert. Im intermittierenden Modus schwingt der flexible Arm mit einer gewissen Frequenz, was die Sensitivität für stark elastische Objekte in Flüssigkeit erhöht.

Die Messung mit der Rasterkraftmikroskopie wurde am Institut für Physik (AG Molekulare Festkörperphysik, Prof. Witte, Philipps Universität Marburg) unter Leitung von Mira El Helou durchgeführt. Als Objekt dienten polar, konfluent gewachsene MDCK II Zellen auf einer Glasschale, die zuvor in 4 % Paraformaldehyd für 15 min fixiert wurden. Die Messung erfolgte im intermittierenden Modus mit einem *Cantilever* der Firma Anfatec des Typs NSC18/Co-Cr.

3.7 Proteinmarkierung

3.7.1 Coomassie

Zur Markierung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel (s. 3.5.8 und 3.5.9) wurde die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbemethode angewandt. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an basische Seitenketten von Aminosäuren und kann daher ebenfalls zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen benutzt werden (Fazekas de St Groth *et al.*, 1963). Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 µg.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 2 - 18 Stunden in der Coomassie-Färbelösung (s. 3.2) geschwenkt und danach 3 Mal in ddH₂O gewaschen, woraufhin das Gel in Entfärbelösung inkubiert wurde, bis klare Banden von Protein zu erkennen waren.

3.7.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist im Gegensatz zur Coomassie-Brilliant-Blue-Färbemethode sensitiver und kann Protein bis 0,1 ng nachweisen. Ebenfalls kann damit DNA und RNA markiert werden.

Hierbei wurden in einem ersten Schritt die Proteine nach der Elektrophorese auf dem Gel in 50 % Methanol und 5 % Essigsäure in ddH₂O fixiert. Nach 20 min wurde das Gel für 10 min in

50 % Methanol gewaschen und weitere 10 min in ddH₂O inkubiert, um die restliche Säure zu entfernen. Es folgte die Sensitivierung des Gels in 0,02 % Natriumthiosulfat für eine Minute, wonach zweimal in ddH₂O gewaschen wurde. Zur Färbung des Gels wurde es in einer 0,1 % Silbernitratlösung inkubiert und wiederum zweimal in ddH₂O gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 0,04 % Formalin und 2 % Natriumcarbonat unter intensivem Schütteln, bis intensive hell-, dunkelbraune Banden zu erkennen waren. Gelagert wurde das Gel in 5 % Essigsäure.

3.7.3 Spezifische Proteinmarkierung

3.7.3.1 Alexa Fluor® 647

Nach Aufreinigung eines rekombinanten Proteins wurde es mit Alexa Fluor® 647 markiert, um Kollokalisierungen mit anderen Proteinen zu untersuchen. Dazu wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (Alexa Fluor® 647 *Protein Labeling Kit, Invitrogen*) und das markierte Protein von nicht gebundenem Fluorophor mittels Größenausschlusschromatographie (s. 3.5.7) getrennt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Nanodrop, wobei im Programm das Fluorophor zuvor definiert wurde.

Die Markierungseffizienz konnte mit folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Mol Farbstoff per Mol Protein} = \frac{A_{650} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Ex}_{\text{Alexa Fluor}^{\circledR} 647} \times \text{Proteinkonzentration (M)'}}$$

wobei A_{650} der Absorption bei der Wellenlänge 650 nm und $\text{Ex}_{\text{Alexa Fluor}^{\circledR} 647}$ dem Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs entspricht. Dieser liegt bei Alexa Fluor® 647 bei $239.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Formel 3-4 Bestimmung der Markierungseffizienz von Alexa Fluor® 647 an einem Protein

3.7.3.2 Snap-Tag®

Zur Untersuchung der Sortierprozesse des Neurotrophinrezeptors p75 unter Galectin-3 wurde ein Fusionsprotein kloniert, das aus p75 und einem Snap-Tag® Protein (New England Biolabs, Massachusetts) bestand. Snap basiert auf einer humanen O⁶-alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT), das spezifisch mit Benzylguaninderivaten reagiert, wobei Guanin frei wird und ein Markierungssubstrat wie Oregon Green®, das mit Guanin verbunden war, kovalent mit dem Enzym verknüpft wird (Keppler *et al.*, 2004). Snap ist im Vergleich zum GFP-Protein (27 kDa) 20 kDa groß und kann ebenfalls mit einem Blockierungsreagenz irreversibel assoziiert werden.

Mit dieser Eigenschaft ergibt sich ein Spektrum an neuen Möglichkeiten fluoreszierende Proteine in der lebenden Zelle zu beobachten.

Nach Klonierung (s. 3.8.1) wurde das Plasmid stabil in die MDCK II Zelllinie transfiziert (s. 3.9.5) und mit Oregon Green® markiert. Dazu wurden die Zellen mit dem Substrat (5 µM) in Zellkulturmedium für 30 min bei 37 °C inkubiert, dreimal gewaschen und für 30 min in Zellkulturmedium ohne Substrat inkubiert, damit nicht gebundenes Substrat aus der Zelle hinausdiffundieren konnte. Die Zellen waren nun bereit für die Lebendzellmikroskopie.

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerasekettenreaktion dient zur Amplifikation von DNA. Sie besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Zuerst werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aufgebrochen, dann binden zwei Oligonukleotide an dem jeweils entgegengesetzten Strang und im letzten Schritt wird die Verlängerung der DNA über die Polymerase eingeleitet (Mullis *et al.*, 1986). Die Oligonukleotide setzen dabei jeweils in 5' → 3' Richtung am vorwärts- und rückwärts-gerichteten DNA-Strang an und begrenzen damit den Anfang und das Ende des Produktes der Reaktion.

Für die Reaktion wurde die Phusion® (NEB) verwendet, da sie im Gegensatz zu anderen Polymerasen eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität besitzt, die dazu befähigt ist, Fehler während der Amplifikation zu erkennen. Die Polymerase wurde mit synthetisierten Oligonukleotiden, Mononukleotidtriphosphate (dNTPs) und den zu amplifizierenden DNA Abschnitts gemischt (s. Tabelle 3-6) und über mehrere Zyklen, die sich in Temperatur und Zeit unterschieden (s. Abbildung 3-3), inkubiert. Variiert wurden dabei die Zyklenanzahl, die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide und die Polymerisationszeit entsprechend der Länge des Produktes.

Tabelle 3-6 Reaktionsansatz zur Polymerase-Ketten-Reaktion

Komponenten	Reaktion (µL)	Endkonzentration
NTP	1	200 µM
Oligonukleotid (vorwärts)	2,5	0,5 µM
Oligonukleotid (rückwärts)	2,5	0,5 µM
DNA	variabel	< 100 ng
Puffer (HF®, NEB)	10	1 x
Polymerase	0,5	1 U
ddH ₂ O (autoklaviert, filtriert)	auf 50 µL auffüllen	

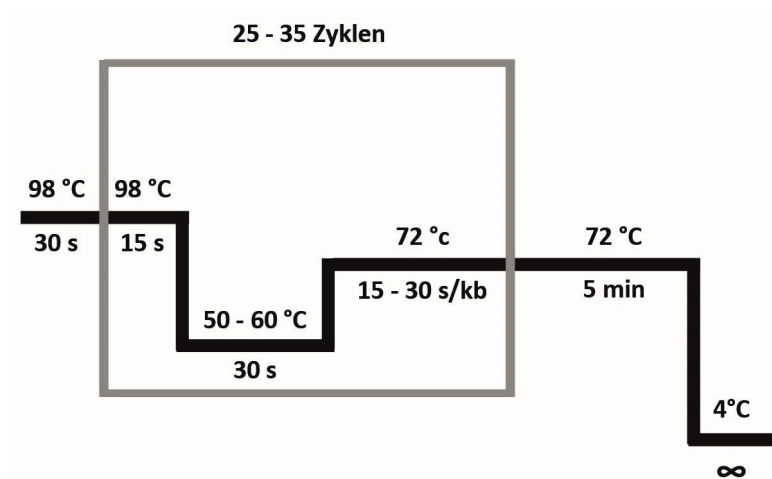


Abbildung 3-3 Schema zur Zyklendarstellung während der Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur analytischen Kontrolle wurde nach der Reaktion 5 µL jedes Ansatzes in Ladebuffer (*Thermoscientific*) aufgenommen und in einem 1 % Agarosegel bei 80 - 100 V aufgetrennt.

3.8.2 DNA-Restriktion

Um gezielt DNA-Abschnitte aus einem Plasmid zu isolieren, wurden Restriktionsendonukleasen aus Bakterien eingesetzt. Diese Enzyme erkennen spezifische, palindromische Basenabfolgen und spalten die DNA an dieser Stelle.

Zur Restriktion wurden 1 µg DNA verwendet, die mit 1 µL des entsprechenden Enzyms versetzt wurden. Es folgte die Inkubation bei 37 °C mit zeitlichen Angaben des Herstellers. Ebenfalls konnten die Enzyme durch hohe Hitze deaktiviert werden, wodurch der Aufreinigungsschritt bei gewissen methodischen Vorgehensweisen eingespart werden konnte. *FastDigest*®-Enzyme und Reaktionspuffer wurden von *Thermoscientific* bezogen.

3.8.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung von DNA-Stücken in einem Agarosegel wurden nach UV-Detektion gezielt DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und extrahiert. Dies geschah mittels der *freeze and squeeze*-Technik (einfrieren und ausdrücken). Dabei wurde zuerst das Gelstück in flüssigem Stickstoff für ca. eine Minute eingefroren und dann zwischen zwei Seiten eines zusammengeklappten Parafilm-Blattes (*Pechiney Plastic Packaging*) gelegt. Nach leichtem Antauen des Stückes mit Hilfe des Fingers, konnte mit einem Glasobjektträger das Stück vorsichtig zerdrückt werden. Die isolierte Flüssigkeit wurde mit einer Pipette aufgenommen und die enthaltene DNA ausgefällt. Dies geschah durch Zugabe von 3 M Natriumacetat (1/10 Volumen der DNA-Lösung) und 96 % Ethanol (zweifaches Volumen) bei 4 °C für 10 min. Nach

Pelletierung der DNA bei 13.000 rpm für 15 min wurde sie mit 70 % Ethanol gewaschen und der vorherige Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Alkohol wurde abgesaugt und das Pellet bei 37 °C für 15-30 min getrocknet. Nach Aufnahme in 20 µL ddH₂O wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.8.4 Ligation

Zur Ligation von einem geschnittenen DNA-Fragment (Insert) mit einem Plasmid (Vektor) wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Es wurden zuvor die DNA-Konzentrationen beider Proben mit einem Nanodrop-Gerät bestimmt und im Verhältnis 1:2 bis 1:10 (Vektor:Insert) eingesetzt. Inkubations- und Mengenangaben der Ligase erfolgten nach Herstellerangaben (Thermoscientific) unter Beachtung von „klebrigen DNA-Enden“. Die Inkubationszeit wurde bei Bedarf, um die Effizienz zu erhöhen, auf 1-2 h bei RT erhöht. Nach Ligation wurden die Proben am selben Tag für die Transformation in chemisch-kompetenten *E.coli*-Bakterien weiterverwendet (s. 3.8.5).

3.8.5 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur effizienten Aufnahme von Plasmiden wurden *Escherichia coli* Bakterien verwendet, die entweder spezialisiert auf DNA-Amplifikation (5-alpha, NEB) oder auf Proteinproduktion (BL21 DE3, NEB, s. 3.4.1) waren. Die Transformationseffizienz lag bei $1-3 \times 10^9$ cfu/µg DNA bei 5-alpha Zellen und $1-5 \times 10^7$ cfu/µg DNA bei BL21 DE3 Zellen.

Die Zellen wurden von -80 °C auf Eis für 10 min aufgetaut und mit 5 - 10 µL des Ligationsansatzes vermischt, woraufhin sie nach vorsichtigem Mischen für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C und eine Ruhepause von 5 min auf Eis. Die Bakterien wurde mit 950 µL SOC-Medium (s. 3.2) versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 1.000 rpm inkubiert, woraufhin 50 - 100 µL der Zellen auf eine Platte mit Agarose in LB-Medium (s. 3.2) und einem Selektionsmarker ausgestrichen wurden. Hierbei wurde ein sterilisierter Glasspatel verwendet und alles in der Nähe einer Feuerflamme durchgeführt. Der Selektionsmarker bestand entsprechend der Resistenz des Plasmids aus Ampicillin oder Kanamycin (je 25 µg/mL) (s. 3.8.8).

3.8.6 Plasmidisolierung

Die Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien erfolgte mittels der alkalischen Lyse (Birnboim *et al.*, 1979). Hierbei wird genomische DNA selektiv denaturiert und nach Neutralisation bilden sich Aggregate, die durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt werden können.

Gleichzeitig präzipitieren SDS-Proteinkomplexe und RNA, so dass drei der größten kontaminierenden Makromoleküle leicht entfernt werden können.

Am Tag vor der Isolation wurden Kolonien von einer LB-Agarose-Platte mit einer Spitze aufgenommen und in 3 mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker überführt. Die Kultur wurde über Nacht angezogen und 1,5 mL davon wurde für die Isolation verwendet. Die Zellen wurden hierfür für 60 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL Lösung 1 (s. 3.2) aufgenommen, welche zuvor mit RNase (0,1 mg/mL) versetzt wurde. Dann wurden 100 µL von Lösung 2 zugegeben und vorsichtig durch Umdrehen des Reaktionsgefäßes gemischt. Es folgte eine Inkubation bei RT für 5 Min, wonach Lösung 3 hinzugegeben wurde, was wiederum unter vorsichtigem Umdrehen geschah. Nach 10minütiger Inkubation wurde das Gemisch bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt, um Aggregate besser entfernen zu können. Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA durch 450 µL Isopropanol gefällt und für 20 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Nach einem Waschschrift in 300 µL Ethanol wurde das Pellet bei 37 °C für 15-30 min getrocknet und in 50 µL TE-Puffer (s. 3.2) aufgenommen.

Die oben genannten Mengenangaben dienen zur Isolierung von kleineren Mengen an DNA. Größere Mengen an DNA wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits (JetStar 2.0, Genomed, Löhne) durchgeführt, wobei als Ausgangsmenge das Pellet von 200 mL in LB-Medium kultivierten Bakterien diente.

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit einem Nanodrop (Thermoscientific) durchgeführt (s. 3.5.11).

3.8.7 Sequenzierung

Nach erfolgreicher Klonierung und Plasmidisolation wurde zur Überprüfung der korrekten Basenreihenfolge eine Sequenzierung durchgeführt. Dies geschah über die Firma Seqlab (Göttingen), wobei die Probenvorbereitung nach Anweisung der Firma umgesetzt wurde. Zur Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung	Sequenz	Sequenzierung von Vektor
T7 vorwärts	TAATACGACTCACTATAGG	pET3C
pet3C rückwärts	CTGTGGATATCCGGATATAG	pET3C
GFP C1 rev	CATTTTATGTTTCAGGTCAGGG	pEGFP-N1

3.8.8 Auflistung verwendeter und eigener konstruierter DNA-Vektoren

Zur Klonierung von p75-Snap wurde das Konstrukt pSnap-tag®(m) verwendet, mit dem eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt wurde:

Vorwärts gerichteter Primer:

GTT **ACC GGTA** ATG GAC AAA GAC TGC

→ in Fettschrift *AgeI*-Enzymschnittstelle

Rückwärts gerichteter Primer:

GTG **CGG CCG CCTC** ACT CGA GGG ATC C

→ in Fettschrift *NotI*-Enzymschnittstelle

Das PCR-Produkt wurde mit p75-DsRed legiert, nachdem beide mit *AgeI* und *NotI* geschnitten worden waren.

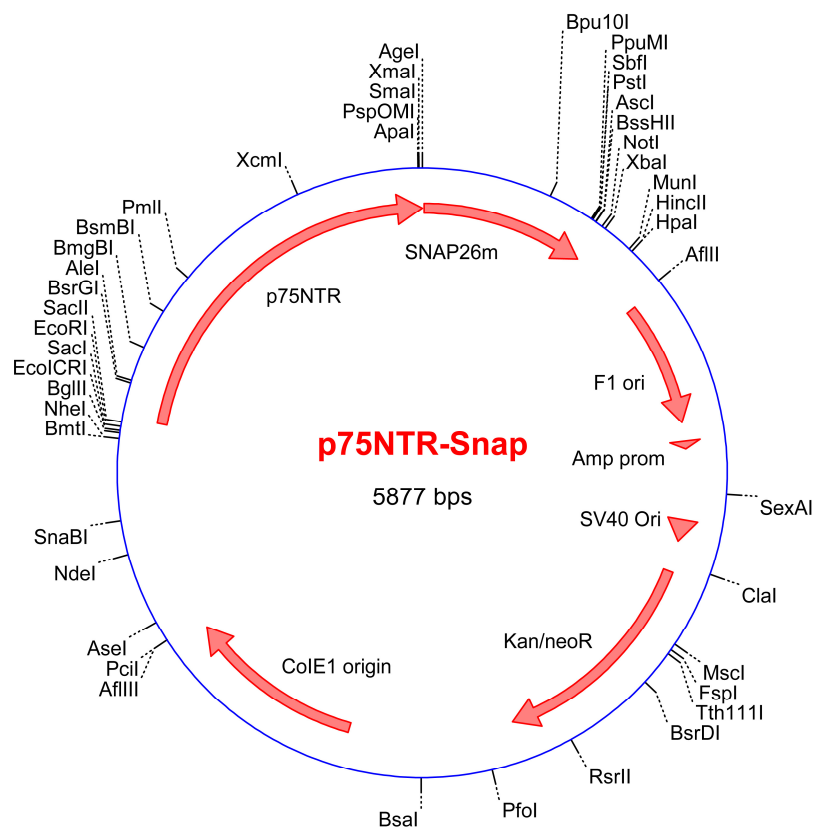


Abbildung 3-4 Plasmidkarte von p75-Snap

Das Konstrukt p75NTR-GFP N1 Zeo (Resistenz Zeocin) wurde hergestellt aus dem Vektor p75NTR-GFP N1 G418 (Resistenz G418), wobei p75NTR-GFP mit den Enzymen *EcoRI* und *NotI* herausgeschnitten wurde. Ligiert wurde das Produkt mit dem Vektor pCDNA4 A, welcher für eine Zeocinresistenz codierte.

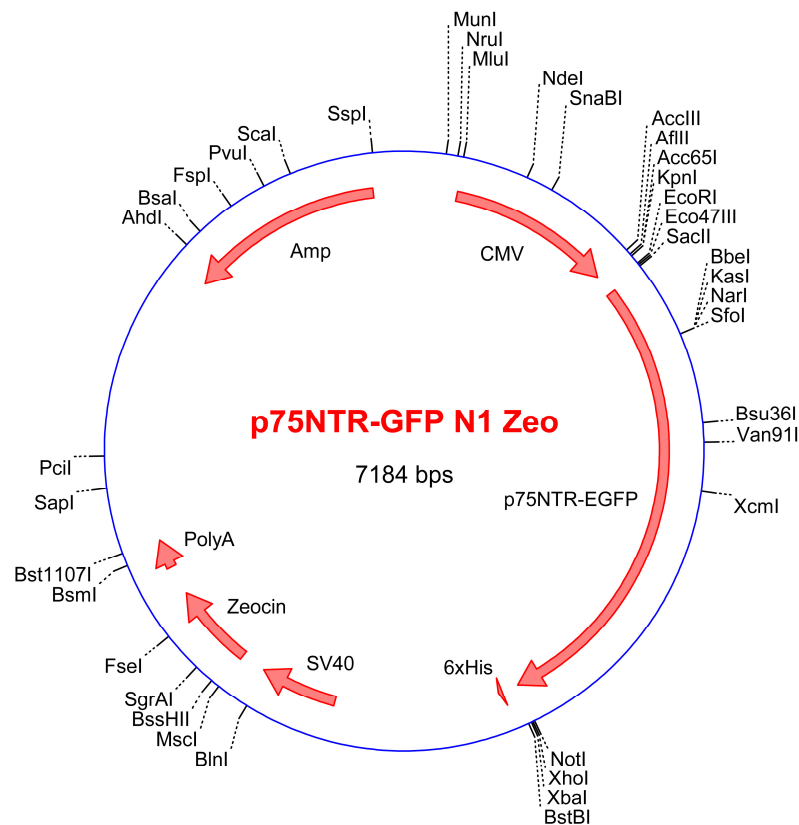


Abbildung 3-5 Plasmidkarte von p75NTR-GFP N1 Zeo

3.9 Zellkultur

3.9.1 Zelllinien

Die MDCK Zelllinie eignet sich, um Prozesse im polarisierten Transport von Epithelzellen zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Zelllinie konnten einige Grundlagen zum Aufbau der sekretorischen Transportmaschinerie aufgeklärt werden (Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005) und sie etablierte sich in der Zellkultur als stabile und leicht zu handhabende Zelllinie. Sie wurde von Madin und Darbin 1958 katalogisiert und stammt aus der Niere eines weiblichen Cockerspaniels. In den späten 1970 Jahren konnten anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen *gap* und *tight junctions* charakterisiert werden und die rekonstituierte epitheliale

Membran zeigte *in vivo* nahe Transport- und Permeabilitätseigenschaften (Cereijido *et al.*, 1978, Misfeldt *et al.*, 1976). Es entwickelten sich in den Jahren mehrere Unterzelllinien, die gezielt für unterschiedliche Fragestellungen geeignet sind (Dukes *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde die MDCK II Zelllinie verwendet, die sich durch einen Widerstand von ca. $100 \Omega/\text{cm}^2$ und durch das Vorhandensein von Sulfatiden in der Membran auszeichnet (Hansson *et al.*, 1986).

3.9.2 Zellkulturlösungen

Kultivierungsmedium

MDCK II Zellen: MEM, 5% FKS, 1% 100x Penicillin, 1% 100x Streptomycin und 1% 100x L-Glutamin

transfizierte MDCK II Zellen: DMEM, 10 % FKS, 1% 100x Penicillin, 1% 100x Streptomycin, 1% 100x L-Glutamin, 0,5 mg/mL G418 oder 0,2 mg/mL Zeocin

Transfektionsmedium

MEM ohne weitere Zusätze

Selektionsmedium

DMEM, 10 % FKS, 1% 100x Penicillin, 1% 100x Streptomycin, 1% 100x L-Glutamin und wahlweise mit 1 mg/mL G418 oder 0,4 mg/mL Zeocin

Passagenlösung

0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in D-PBS

Einfriermedium

Zellkultivierungsmedium mit 10 % FKS und 10 % DMSO

3.9.3 Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen fand in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit statt. Dabei wurden die Zellen in 3, 6 oder 10 cm Schalen bzw. auf PET-Filtern kultiviert (s. Abbildung 3-6). Der Vorteil der PET-Filter bestand darin, dass die Zellen stärker polarisierten und eine basolaterale bzw. apikale Applikation durchgeführt werden konnte. Es entstand ein homogener Zellrasen, der nicht durch die Bildung von sogenannten Kuppeln infiltriert war. Diese entstanden in der Plastikschielle durch die hohe Transzytoserate der Zellen von Ionen und H₂O. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

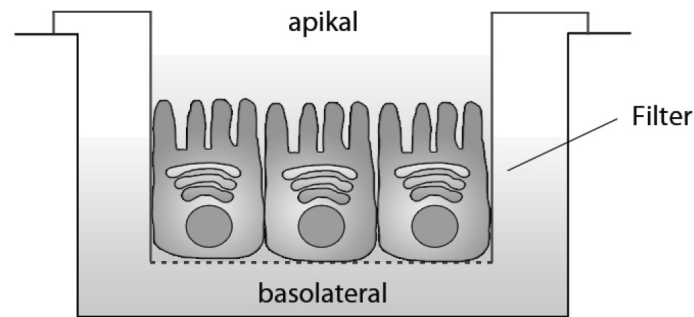


Abbildung 3-6 Filtereinsatz zur Kultivierung von MDCK II Zellen (Dissertation von Dominik Schneider)

3.9.4 Zellpassage

Die Zellen wurden nach fünf- bis zehntägiger Kultivierung passagiert. Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und danach für 30 min in einer Passagierlösung (s. 3.9.2, s. Tabelle 3-7) bei 37 °C inkubiert. Diese Lösung enthielt Trypsin, das die Adhäsion von Membranproteinen zum Schalenuntergrund und zu benachbarten Zellen löste, und EDTA, welches als Kalzium-Chelator wirkt und damit Bindungen zwischen Kalzium-bindenden Proteinen aufhob (bspw. Cadherinen). Die Wirkung der Lösung wurde mit 5x Volumen Zellkulturmedium gestoppt und die gelösten Zellen bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Es folgte eine Passagierung der Zellen im Verhältnis zur Größe der Schale (s. Tabelle 3-7), in denen sie weiterkultiviert wurden. Dabei wurde die Menge an Zellen einer 10 cm Schale in 10 mL Kultivierungsmedium aufgenommen.

Tabelle 3-7

	Volumen Passagierlösung (mL)	Verhältnis Passagierung	Volumen an Zellen aus 10 mL Kultivierungsmedium (mL)
10 cm Schale	2	1 : 4 bis 1 : 10	1 bis 0,4
6fach Schale	0,5	1 : 100	0,1
24fach Schale	0,2	1 : 500	0,02

3.9.5 Stabile Transfektion der MDCK II Zelllinie

Die stabile Transfektion (Integration eines Gens ins Genom der Zelle) wurde mittels Lipofectamin2000 (Invitrogen) durchgeführt. Das Reagenz besteht aus positiv geladenen Lipiden, die mit der zu transfizierenden DNA komplexieren und durch elektrostatische Interaktion mit der in Summe negativ geladenen Membran der Zelle fusionieren und so in das Zytosol gelangen. Nicht ganz klar ist dabei, ob hierbei von einer Endozytose oder einer direkten Applikation in das Zytosol auszugehen ist. Alle stabilen Transfektionen enthielten

Fusionsproteine, die direkt oder nach Koppelung eines Fluorophors unter einem Fluoreszenzmikroskop positive selektioniert wurden.

Das Lipofectamin2000 (10 µL) wurde dafür in 3 mL Transfektionsmedium (s. 3.9.2) pipettiert und für 5 min inkubiert. Parallel wurde DNA (5 µg) ebenfalls für 5 min in 1,5 mL Transfektionsmedium gehalten, wobei beide Lösungen danach für 20 - 30 min zusammen inkubiert wurden. Die Zellen für die Transfektion wurden am Tag zuvor 1:4 von einer dicht bewachsenen 10 cm Schale gesplittet und zeigten nach 24 Stunden eine Konfluenz von ca. 50 %. Diese wurde zwei Mal mit PBS gewaschen und mit der Kombinationslösung aus DNA und Lipofectamin2000 für sechs bis acht Stunden inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel mit Zellkulturmedium für MDCK II Zellen und eine weitere Inkubation für 24 Stunden, woraufhin die Transfektion nochmals wiederholt wurde. 48 Stunden später wurden die Zellen in Selektionsmedium (s. 3.9.2) vereinzelt (1:25, 1:50, 1:100, 1:200) und für weitere sieben bis neun Tage kultiviert. Hierbei zeigte sich als positiver Indikator, dass eine stabile Transfektion erfolgreich war, wenn die Zellen runde Kolonien ausbildeten. Diese wurden im weiteren Verlauf von der Platte abgestrichen und jede Kolonie separat nochmals sieben Tage in Kultivierungsmedium gehalten wurde. Das Abstreichen geschah durch Inkubation mit in Passagenlösung getränkten Whatman-Papieren, die ca. die Größe einer Kolonie besaßen. Diese wurden nach 30 min mit einer Pinzette aus der Schale genommen und in eine vorbereitete 24fach Schale überführt. Nach Passagieren der Zellen in eine 6 Fach Schale und parallel auf eine weitere 24fach Schale, die am Boden mit einem Deckglas für die Mikroskopie bedeckt war, wurden die Zellen nochmals für drei bis fünf Tage kultiviert, um anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht zu werden.

3.9.6 Aufbewahrung und Auftauen von Zellen

Zur Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum wurde jede Zelllinie in vier bis acht Ansätzen in einer 10 cm Schale bis zur Konfluenz inkubiert. Nach Ablösen der Zellen in 2 mL Passagierlösung wurden diese in 5x Volumen an Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 800 xg zentrifugiert. Die Menge an Zellen einer 10 cm Schale wurde in 1 mL Einfriermedium (s. 3.9.2) aufgenommen und in ein Mikro-Schraubröhrchen bzw. Cryoröhrchen (Volumen 2 mL) aliquotiert. Die Zellen wurden daraufhin für 24 bis 48 Stunden bei -80 °C gelagert, um danach in einem Stickstofftank bei -180 °C aufbewahrt zu werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen 2-3 min bei RT inkubiert und in 9 mL Kulturmedium aufgenommen. Es folgte eine Pelletierung bei 800 xg für 5 min und die Menge an Zellen eines

Cryoröhrchens vollständig auf eine 10 cm Schale überführt. Nach 24 Stunden konnte dann mit der üblichen 1:4 Passagierung fortgefahren werden.

3.9.7 Poly-L-Lysin Beschichtung

Um die Anhaftung von Zellen oder Lipidvesikeln in Lösung zu verbessern, wurden Glasbodenplatten mit Poly-L-Lysin beschichtet. Diese Aminosäure verursacht eine positive Oberflächenladung, womit die vorrangig negativ-geladene Zellmembran interagieren kann.

Es wurden dafür Glasbodenplatten (1,8 cm im Durchmesser) über Nacht bei 4 °C mit Poly-L-Lysin (0,01 mg/mL) inkubiert, zwei Mal mit ddH₂O gewaschen und für eine Stunde bei RT getrocknet.

3.9.8 Verwendete Zelllinien

Tabelle 3-8

Zelllinie	Exprimierendes Protein	Medium
MDCK	-	MEM, 5 % FKS, PSG
MDCK GPI-YFP	Glycosylphosphatidylinositol-Anker fusioniert mit YFP	DMEM, 10 % FKS, PSG, G418
MDCK p75-GFP	Neurotrophinrezeptor p75 fusioniert mit GFP	DMEM, 10 % FKS, PSG, G418
MDCK Gal3-DsRed	Galectin-3 fusioniert mit DsRed	MEM, 5 % FKS, PSG, Zeocin
MDCK Cav1-CFP	Caveolin-1 fusioniert mit CFP	MEM, 5 % FKS, PSG, G418
MDCK Flot1-YFP	Flottilin-1 fusioniert mit YFP	DMEM, 10 % FKS, PSG, G418
MDCK SI-YFP	Succrose-Isomaltase fusioniert mit YFP	DMEM, 10 % FKS, PSG, G418
MDCK LPH-YFP	Lactose-Phlorizin-Hydrolase fusioniert mit YFP	DMEM, 10 % FKS, PSG, G418

3.10 Biochemische Methoden

3.10.1 Western-Blot

Bei diesem Verfahren werden elektrophoretisch Proteine aus einem Acrylamidgel auf eine Trägermembran übertragen (Towbin *et al.*, 1992). Sie entstand in Anlehnung, an die von Edwin Southern erfundene Methode zum Nachweis von DNA-Fragmenten auf einer Membran (Southern 1975). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Proteine auf der Membran fixiert sind, so dass sie für weitere Anwendungen verwendet werden können. Bei der elektrophoretischen Übertragung (im Vergleich zur Diffusion oder Kapillarwirkung) wird das Gel in ein elektrisches Feld eingespannt, an dem die stark negativ-geladenen SDS-besetzten Proteine entlangwandern und über ionische und polare Wechselwirkungen an der Membran haften bleiben (Nitrocellulosemembran, Whatman, GE Healthcare).

Es wurde nach der *semi-dry*-Methode gearbeitet, wonach während des Vorgangs die Apparatur zwar befeuchtet war, allerdings nicht komplett in einem Bassin aus Transferpuffer lag. Hierzu wurde die Apparatur wie folgt aufgebaut (s. auch Abbildung 3-7): Die positive Elektrode war zu unters, darauf wurde ein Whatmanpapier gelegt, gefolgt von der Nitrocellulosemembran und dem SDS-Gel. Abgedeckt wurde wiederum mit einem Whatman-Papier und der negativen Elektrode. Die Apparatur lief über 50 - 60 min bei 12 V. Danach wurde die Membran für eine Stunde mit einem Blockreagenz (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS leicht schüttelnd inkubiert und für 5-20 min drei Mal in PBS gewaschen. Es folgte die Antikörperbindung an das zu detektierende Protein für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach drei erneuten Waschschritten wurde mit einem zweiten Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert, der spezifisch den Fc-Teil des ersten Antikörpers erkannte und an dem das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt war.

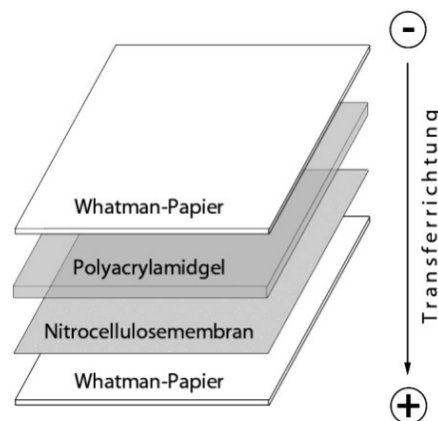


Abbildung 3-7 Schematischer Aufbau einer Western-Blot Apparatur (mit freundlicher Genehmigung von Dominik Schneider)

3.10.2 Dot-Plot

Für die Analyse von Lipidinteraktionen wurden zur quali- und quantitativen Bestimmung des bindenden Proteins so genannte *Dot Plots* (englisch für punktförmige Fläche) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist zum einen, dass zuvor keine elektrophoretische Auftrennung wie bei dem *Western Blot*-Verfahren erfolgen muss, und dass man unabhängig von der Lysatmenge ist, da das komplette Volumen auf die Membran aufgetragen werden kann. Dies geschieht mittels einer Vakuumpumpe, die das Lysat durch die Membran zieht, so dass Proteine an der Nitrocellulose hängen bleiben. Des Weiteren können bis zu 96 Proben auf einer Membran analysiert werden. Nachteil dieser Methode ist, dass ein hoher Hintergrund

entsteht, den man jedoch durch geeignete Kontrollen vermeiden kann, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

Das Lysat bestand aus Lipid- und Protein-Fraktionen, die mittels Flotationsmethode isoliert wurden (s. 3.10.3). Es waren jeweils 120 μL , die über die Dot-Plot Apparatur (Pall Acrowell filter plate) auf die Membran aufgetragen wurden. Danach wurde der Schlauch einer Vakuumpumpe an jedem Fach der Platte angehalten, bis die komplette Flüssigkeit durchgezogen war. Es folgte eine Immundetektion ähnlich des Western-Blot-Verfahrens (s. 3.10.1).

3.10.3 Flotation

Die Flotation beschreibt die Trennung von unterschiedlichen Substanzen in einem Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation. Proteine können somit von Liposomen getrennt werden, da sie in einem dichteren Medium verbleiben, wohingegen Liposomen aus dem dichteren Medium herausflotieren.

Um eine Interaktion zwischen Galectin-3 und Lipiden eines Liposoms zu detektieren, wurden die Liposomen mit entsprechenden Lipiden zunächst synthetisiert (s. 3.3.1.1). Die Konzentration der Liposomen war, falls nicht anderes angegeben, 1 mg/mL. Diese wurden vor der Flotation für 30 min mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteins inkubiert. Es folgte die Beladung des Gradients, der aus vier Stufen bestand (15, 10, 2,5, 0 % Nycodenz, von unten nach oben). Das Protein-Lipid-Gemisch wurde mit der untersten Stufe resuspendiert und die darauffolgenden Stufen vorsichtig mit einer extralangen Spitze (1 - 200 μL MultiFlex Round, Sorenson) aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass kontinuierlich beschichtet wurde, da eine tröpfchenweise Abgabe die Stufen miteinander vermischt hätten können. Die Spitze wurde dabei immer an der Oberfläche des Mediums entlang nach oben im Zentrifugationsröhrchen geführt. Zur Kontrolle wurde mit dem Auge festgestellt, ob Stufen zu erkennen waren, da sich Licht an diesen Stellen brach. Die Proben wurden dann bei 40.000 rpm für eine Stunde zentrifugiert. Hierbei konnte wieder mit dem Auge kontrolliert werden, ob die Liposomen flotiert waren, da sie eine dünne milchig-weiße Schicht am Übergang von der 2. zur 3. Stufe bildeten. Es wurde nun in mehreren Fraktionen à 120 μL von oben Proben entnommen, von denen Proben 1-4 gesammelt und wenn angegeben auf 100 μL eingengt wurden. Diese Proben wurden dann für die weitere Verwendung in Laemmli-Puffer (2:1) aufgenommen und bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

3.10.4 Lipidbandstreifen-Blot

Eine weitere effiziente Methode zur Detektion einer Interaktion zwischen Proteinen und Lipiden ist der Lipidbandstreifen-Blot. Hierbei werden die Lipide zuvor auf einer Nitrocellulosemembran gebunden, mit der dann das Protein inkubiert werden kann. Dieses wird darauffolgend mittels der Immunoblotmethode qualitativ bestimmt.

Der Blot (Sphingo Strip, Echelon) wurde für 1 h in 3 % BSA (fettsäurefrei) in TBS-T geblockt und über Nacht mit 1 µg Protein (3 % BSA in TBS-T) bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde daraufhin für 10 min 3x in 3 % BSA in TBS-T gewaschen und für 1 h mit dem ersten Antikörper bei RT versetzt. Nach dreimaligem Waschen wurde der zweite Antikörper auf die Membran für 1 h gegeben und erneut 3x gewaschen, woraufhin die Membran über Elektrochemolumineszenz entwickelt wurde.

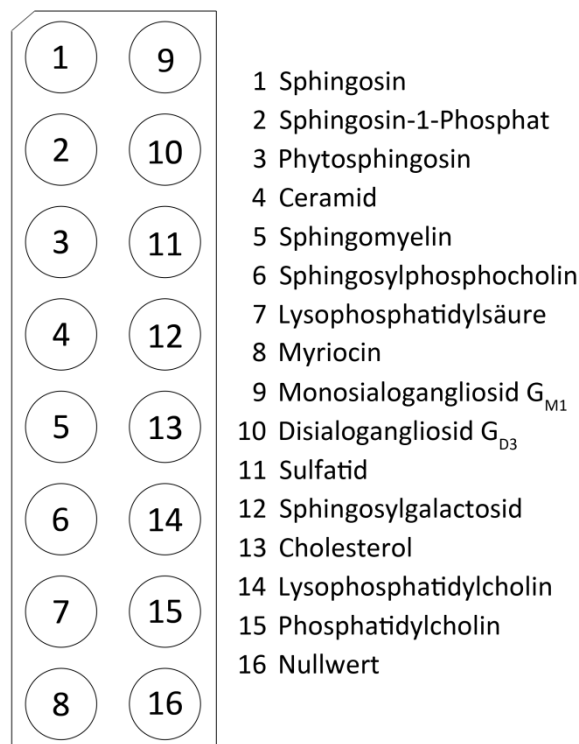


Abbildung 3-8 Verteilung der Lipide auf einem Lipidbandstreifen-Blot

3.10.5 MSD-Technologie

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Kai Simons (MPI-CBG, Dresden) wurde die folgende Methode durchgeführt:

Diese Technologie wurde dazu entwickelt, immunbiochemisch Bindungen zwischen Substanzen nachzuweisen. Als Grundlage dienen dabei Nanoröhren aus Carbonfasern, die auf dem Boden einer Platte beschichtet sind. Sie besitzen die Eigenschaft Proteine, Lipide oder Glykane fest an sich zu binden. Somit kann flexibel für alle möglichen Untersuchungsbedingungen eine individuelle Grundlage gebildet werden, um Interaktionen zu detektieren. Ein weiterer Vorteil ist, dass man mit kleinen Volumina ($< 3 \mu\text{L}$) arbeiten kann und eine hohe Durchsatzrate erzielt, da Platten von bis zu 384fach verwendet werden können, wodurch die idealen Bedingungen zur Affinitätsmessung schnell etabliert sind. Das Detektionssignal ist Elektrochemilumineszenz, wobei die Bodenplatte unter Spannung gesetzt wird und Substanzen im Detektionssubstrat in der Folge oxidiert werden, die spontan wieder reduziert werden und dabei Licht emittieren. Die reduzierte Substanz kann danach durch einen erneuten Elektronenfluss oxidiert werden, wodurch Signale potenziert werden.

Zum Nachweis von Interaktionen dienten LUVs (s. 3.3.1.1), die von den Nanoröhren der beschichteten 384fach Platte gebunden wurden. Daraufhin wurde die Platte für 1 h in 0,5 % Gelatine unspezifische Bindungsstellen blockiert und folgend für 2 h mit dem Zielprotein inkubiert. Die Platte wurde drei Mal mit 0,5 % Gelatine gewaschen und für eine Stunde mit dem Antikörper (1:200) gegen das Zielprotein versetzt. Daraufhin wurde wiederum drei Mal gewaschen und der zweite Antikörper (1:500), der sich gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers richtete, hinzugegeben. Nach einer Stunde wurde zum letzten Mal gewaschen, die Platte mit dem Detektionssubstrat versetzt und unmittelbar mit einem Sector® Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Maryland) gemessen.

3.11 Datenerhebung und -auswertung

3.11.1 Fluoreszenzintensitätsanalysen

Zur Verteilung von Fluoreszenzintensitäten in GPMVs wurde das Bildbearbeitungs- bzw. Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.46r) verwendet. Dieses quelloffene Programm ist vielseitig einsetzbar und kann über eine Reihe von Modulen erweitert werden. Zur Erhebung von Intensitätsmaxima innerhalb eines Kreises wurde das Modul *ovale profile plot* (entwickelt von Bill O'Connell) verwendet. Als Grundlage musste ein 8 Bit Bild geladen werden. Dann wurden die Kreisintensitäten an insgesamt 360 Punkte vermessen und die maximalen Intensitäten in Grauwerten zwischen 0 und 255 zur Auswertung erhoben. Diese Daten wurden in Excel (Microsoft Office) eingefügt und der Mittelwert der Intensitäten mit Standardabweichung berechnet. Die Ratio aus Standardabweichung und Mittelwert, die ein

Maß für die relative Schwankung der Intensitäten um den Mittelwert angab, wurde für die statistischen Analysen in GraphPad Prism (Version 5.03) verwendet.

3.11.2 Statistik

Für jegliche statistische Auswertung in dieser verfassten Arbeit wurde das Programm GraphPad Prism in der Version 5.03 verwendet.

Generell wurde ein t-Test durchgeführt, wenn es um zwei Datensätze ging, die miteinander verglichen werden sollten. Wurden allerdings mehrere Datensätze erhoben, die alle miteinander verglichen werden sollten, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA - *analysis of variance*) gefolgt von einem Bonferroni t-Test, bei dem selektierte Datensätze ausgewählt wurden, durchgeführt. Dargestellt sind dabei die Mittelwerte \pm Standardfehler.

4. Ergebnisse

4.1 Biochemische Analysen von Galectin-3

Galectin-3 ist am Aufbau des Epithels in Lunge, Darm und Niere beteiligt und unterstützt unser Immunsystem durch Modulation der T-Zellen. Es hat vielfältige Aufgaben, die auf Grundlage einer β -galactosidischen Bindung beruhen. Galectin-3 kann als einziges Mitglied seiner Familie höhere Oligomere ausbilden und mit seinem Liganden einen Komplex eingehen. Durch Kombination dieser beiden Funktionen übt Galectin-3 sein weitreichendes Wirkungsspektrum in der Zelle aus. Als Beispiel wäre hier eine Zell-Zell-Adhäsion zu nennen, bei der das Protein benachbarte Liganden bindet und dadurch Membranen zweier Zellen adhärieren können. In der Zelle wirkt Galectin-3 u.a. in Endosomen und unterstützt durch Interaktionen mit unterschiedlichen Liganden die Sortiermaschinerie der Zelle (Delacour *et al.*, 2006a, Schneider *et al.*, 2010 und Straube *et al.*, 2013).

Das genaue Wirkprinzip von Galectin-3 in Endosomen ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass Galectin-3 über die Fähigkeit zu oligomerisieren mehrere Liganden zusammenbringen kann und damit den ersten Schritt der Sortierung einleitet (Delacour *et al.*, 2006a). Ob eine Oligomerisierung von Galectin-3 eine Ligandenfokussierung in einem Membranareal bedeutet und inwiefern dies zu einer gezielten Sortierung in der Zelle führt, ist nicht genau geklärt. Des Weiteren ist die Affinität bzw. Spezifität von Galectin-3 in einem sauren Milieu, wie es in Endosomen vorherrscht, noch nicht untersucht worden.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Bindungs- und Komplexierungsfähigkeit von Galectin-3 näher charakterisiert werden. Hierbei wurden folgende Fragen genauer erörtert: Wie kann Galectin-3 als Oligomer detektiert und definiert werden? Wie kann die Affinität von Galectin-3 zu unterschiedlichen Liganden reproduzierbar und mit geringen Proteinmengen beschrieben werden? Wie verändert sich die Affinität des Proteins in saurem Milieu und inwiefern beeinflusst die Oligomerisierung dieses Verhalten?

4.1.1 Tertiär- und quartärstrukturelle Analysen von Galectin-3

4.1.1.1 Aufreinigung von Galectin-3 und dessen Mutanten

Als Grundlage dieser Arbeit wurde das Protokoll zur Aufreinigung von Galectinen und seinen Mutanten dahingehend verbessert, dass der Grad der Reinheit und die Menge an Protein konstant erhöht wurden. Dies wurde durch veränderte Zentrifugationsschritte, intensivere

Waschvorgänge und Einbau von Prozesskontrollstellen, die eine erfolgreiche Aufreinigung bedingten, erreicht. Als Ergebnis konnte eine Reinheit von 90 - 95 % erzielt werden. Davon wurden zwischen 10 - 15 mg Protein des Wildtyps und ca. die Hälfte von den Mutanten aus 1 L Bakterienkultur aufgereinigt (s. Abbildung 4-1).

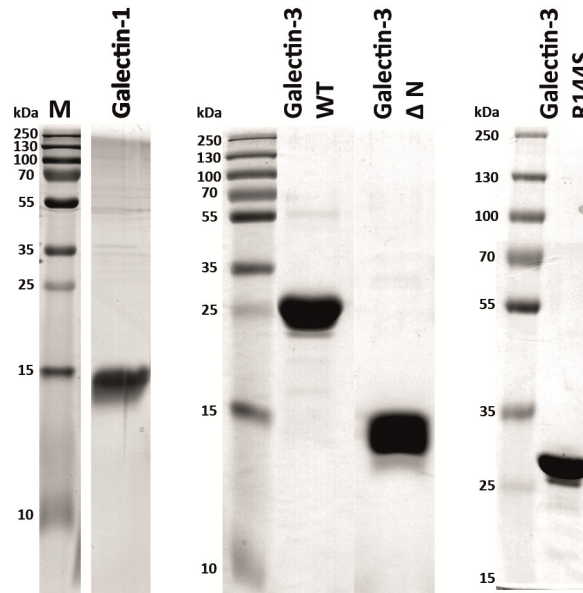


Abbildung 4-1 Coomassie-Färbung der Proteinaufreinigung von Galectinen und seinen Mutanten

Aufreinigung von Galectin-1, Galectin-3 WT (Wildtyp) und die Mutanten von Galectin-3_ΔN (Expression der C-terminalen Domäne) und R144S, wobei die letzte Mutation in der Zuckerbindetasche vorliegt. Dargestellt sind mehrere SDS-Gele, die mittels Coomassie gefärbt wurden. Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Protein, die über eine Lactosesäule aufgereinigt wurden. M - Marker, kDa - Kilodalton

4.1.1.2 Spektroskopische Analyse der Tertiärstruktur von Galectin-3

Zur Untersuchung der tertiären Struktur von humanem Galectin-3 wurden drei Methoden verwendet, die den Zustand des monomeren Proteins bestimmen konnten. Galectin-3 ist 250 Aminosäuren lang, was einer theoretischen Größe von 26,1 kDa als Monomer entspricht (kalkuliert mit *ExPASy ProtParam tool*). Nach Größenausschlusschromatographie (s. 3.5.7) lag rekombinantes Galectin-3 in Puffer zu 91 % (Volumen) rein vor und eluierte nach einem Volumen von 16,5 - 17,4 mL (Maximum bei 16,88 mL) (s. Abbildung 4-2A). Dies entspricht einer Größe von 29,2 - 21,2 kDa (Maximum bei 25,5 kDa). Des Weiteren wurde der Durchmesser des Proteins anhand von röntgenstrukturanalytischen Daten vermessen. Hierbei wurde auf eine bereits veröffentlichte Struktur von Galectin-3-ΔN zurückgegriffen (PDB Nummer 2XG3), die an mehreren Stellen mit Hilfe der Software Pymol (Version 1.2r1) vermessen wurde. Als Grundlage diente dabei die Oberflächendarstellung des Proteins, deren am weitest

herausstehenden Enden als Eckpunkte verwendet wurden. Hiernach hat monomeres Galectin-3 einen mittleren Durchmesser von 43 Å bzw. 4,3 nm (s. Abbildung 4-2B). Bei der dritten Methode wurden DLS-Messungen (dynamische Lichtstreuung, s. 3.5.4) zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers des Proteins in Lösung durchgeführt. Dabei ergab sich eine mittlere Größe von 3-4 nm, welches nahe an die Größenbestimmungen durch Pymol herankommt (s. Abbildung 4-2C).

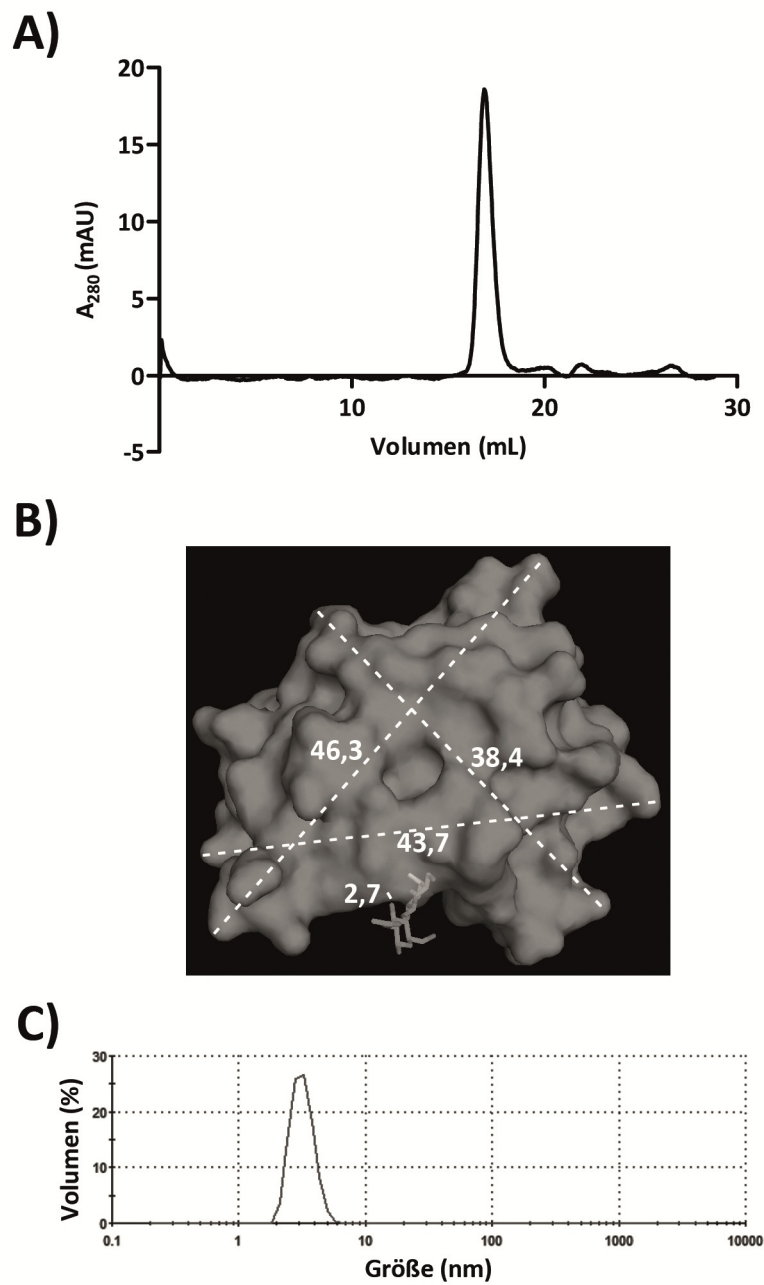


Abbildung 4-2 Größenbestimmung von Galectin-3 (Legende s. nächste Seite)

A) Auftrennung des Proteins Galectin-3 mittels Größenausschlusschromatographie an einem FPLC-System. 100 μ L Galectin-3 (1 mg/mL) wurden in das System injiziert und über eine Sephadex 200 Säule aufgetrennt. **B)** Röntgenkristallstruktur des Proteins Galectin-3 nach Diehl et al. 2010 (PDB 2XG3); zu sehen ist die Oberflächendarstellung auf Grundlage der Elektronendichtewolke. Gemessen wurde mit dem Abstandswerkzeug von Pymol an drei Stellen jeweils mit den am weitest auseinanderstehenden Eckpunkten der Oberfläche in Angström. Als Vergleich dazu ist im unteren Teil des Bildes der Abstand zu dem Inhibitor Benzamido-N-Acetyllactosamin dargestellt (Strichstruktur). **C)** Größenbestimmung des Proteins Galectin-3 mittels DLS; gemessen wurden 100 μ M des Proteins, um eine eventuelle Oligomerisierung ohne Liganden detektieren zu können (s. Abbildung 4-4).

4.1.1.3 Spektroskopische Analyse der Quartärstruktur von Galectin-3 als Oligomer in Lösung

Zur Untersuchung von Galectin-3 in einem oligomeren Zustand wurde das Protein Asialofetuin (ASF) verwendet, das eine Oligomerisierung von Galectin-3 induziert (Lepur *et al.*, 2012). ASF ist ein 48 kDa großes Protein, das sowohl N- als auch O-glykosidisch an bis zu acht Aminosäuren verknüpft ist und ein weites Spektrum an unterschiedlichen Glykosylierungsformen in der Gelfiltration aufzeigte (s. Abbildung 4-3). Kommen beide Proteine zusammen bilden sich hochmolekulare Cluster aus, die mit einer Streulichtmessung detektiert werden können. Diese Untersuchung wurde dazu verwendet, den Charakter des oligomeren Galectin-3 (Quartärstruktur) zu spezifizieren.

Aus Abbildung 4-4 wird ersichtlich, dass 5 μ M Galectin-3 maximal bei einer Konzentration von 3,125 μ M ASF oligomerisiert. Wurde die Konzentration von ASF konstant bei dieser belassen und Galectin-3 hinzutitriert, konnte nach Abzug des Nullwertes eine Oligomerisierung ab 2,5 μ M Galectin-3 detektiert werden. Wurde ASF konstant bei 0,8 μ M gehalten, war ebenfalls eine Oligomerisierung ab 2,5 μ M zu erkennen, wobei bei konstant 20 μ M ASF sie bei 5 μ M begann. Bei allen drei ASF-Konzentrationen konnte kein Maximum erreicht werden. Ebenfalls konnten Lepur *et al.* Daten in ähnlicher Weise messen (Lepur *et al.*, 2012).

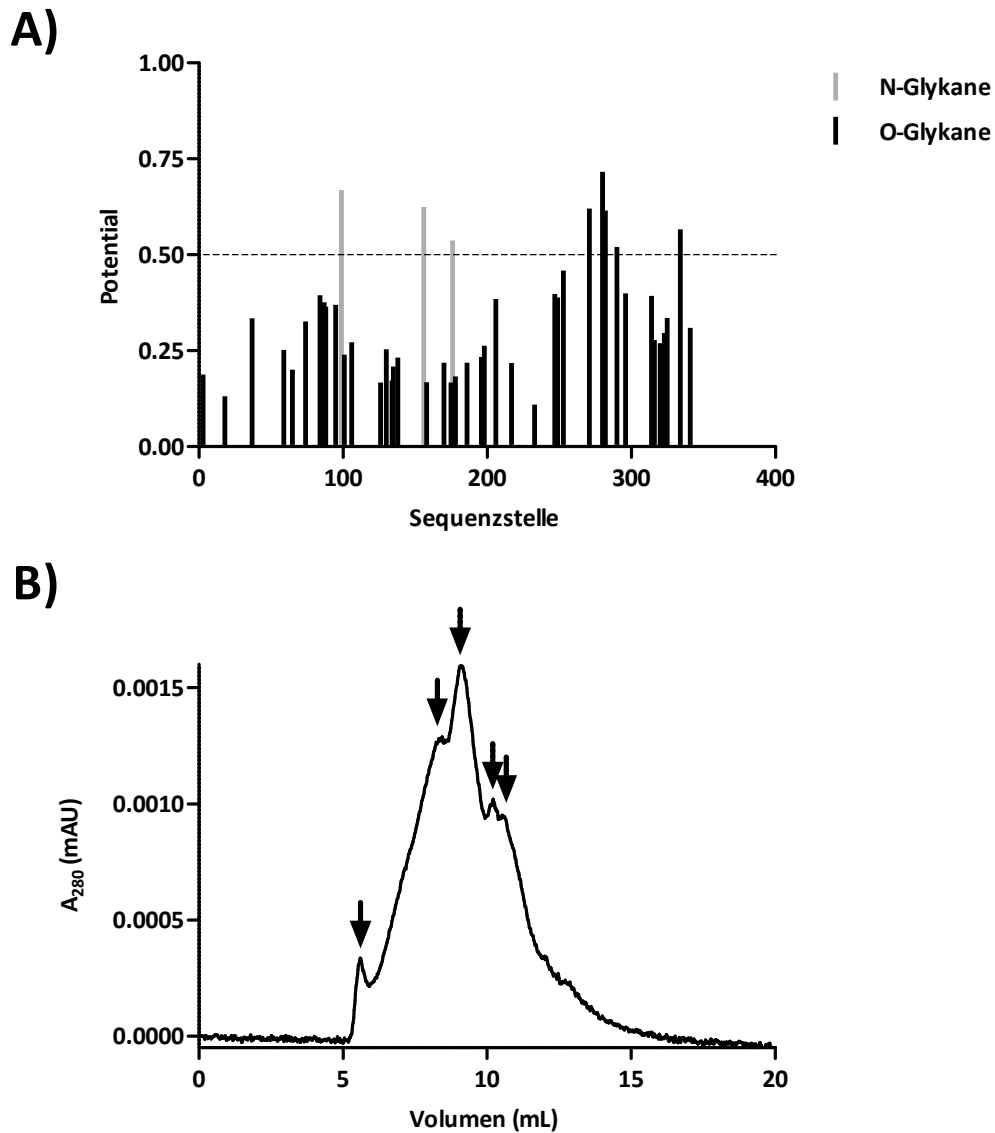


Abbildung 4-3 Glykosylierungsmuster von Asialofetuin (ASF)

A) Dargestellt sind die potentiellen N- bzw. O-Glykosylierungsstellen des Proteins Asialofetuin (Typ I, Sigma-Aldrich). Berechnet wurden die potentiellen Stellen mit den Datenservern NetNGlyc (Version 1.0) und NetOGlyc (Version 3.1). Alle Werte, die über 0,5 Potentialpunkten liegen, haben eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Glykosylierung in der Zelle (gestrichelte Linie). **B)** Auftrennung des Proteins ASF mittels Größenausschlusschromatographie an einem HPLC-System. 100 μ L ASF (4,75 mg/mL) wurden in das System injiziert und über eine Shodex KW-804-Säule aufgetrennt (Pfeile deuten auf einzelne Glykosylierungsformen des Proteins).

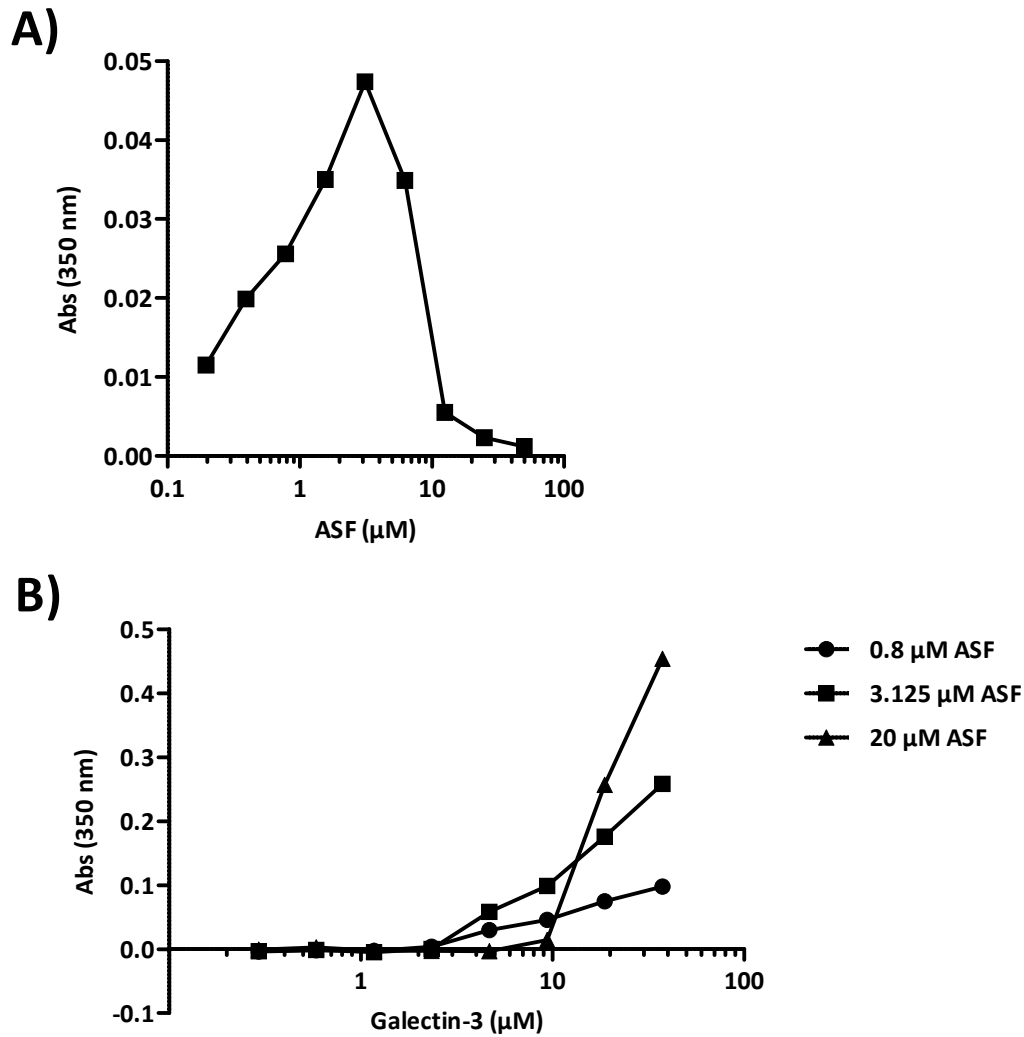


Abbildung 4-4 Oligomerisierung von Galectin-3 mit Asialofetuin

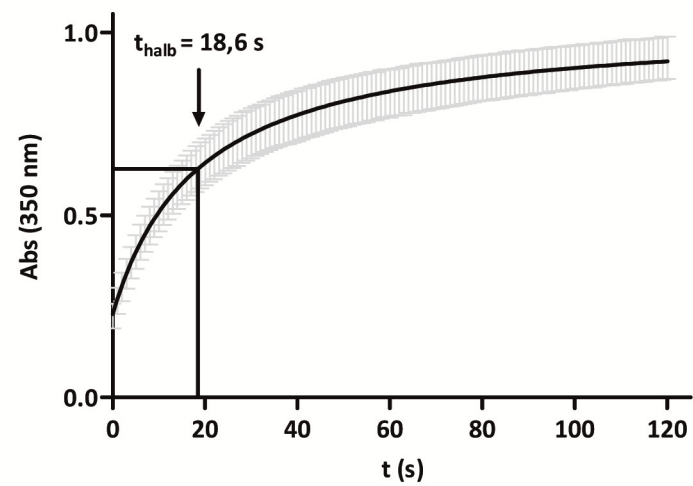
A) Inkubation von 5 μM Galectin-3 mit Asialofetuin (ASF) in aufsteigender Konzentration; **B)** Inkubation von 0,8, 3,125 und 20 μM ASF mit Galectin-3 in aufsteigender Konzentration. Gemessen wurde bei einer Absorption von 350 nm in einer 96-Lochplatte mit einem Tecan M200 Mikroplattenleser 2 bis 5 min nach Vermischung beider Proteine.

Um die Bildung des hochmolekularen Clusters näher zu charakterisieren, wurden Kinetikmessungen vorgenommen, wobei kurz nach dem Resuspendieren beider Proteine eine Streulichtmessung alle 0,1 sec durchgeführt wurde (s. Abbildung 4-5A). Es zeigte sich, dass nach wenigen Sekunden die Oligomerisierung begann und nach 18,6 Sekunden ihren halbmaximalen Wert erreichte. Um zu demonstrieren, ob das Oligomer wieder reversibel gelöst werden konnte, wurde Lactose nach Ausbildung des Komplexes hinzugegeben. Lactose kann Galectin-3 binden, allerdings keine Oligomerisierung induzieren. Nach Zugabe von

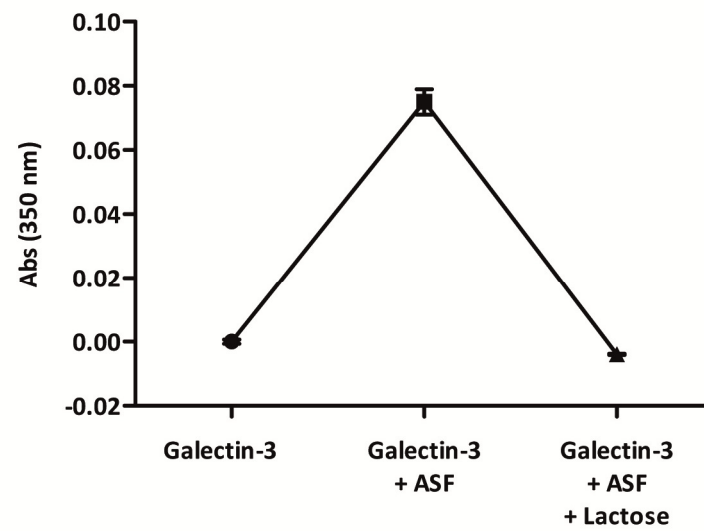
Lactose in hoher Konzentration zeigte sich, dass der Komplex zwischen Galectin-3 und ASF aufgelöst wurde, so dass während der Streulichtmessung kein Unterschied zu reinem Galectin-3 in Puffer detektiert werden konnte (s. Abbildung 4-5B). Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob Galectin-3 unabhängig von der Fähigkeit Zucker zu binden, oligomerisieren kann. Die Mutante Galectin-3_R186S zeigt eine stark verminderte Lactosebindung, wodurch die Aufnahme in die Zelle geschwächt stattfindet (Cumpstey *et al.*, 2007, Schneider *et al.*, 2010). Um den Zucker-abhängigen Einfluss der Bindung während der Oligomerisierung zu illustrieren, wurde Galectin-3_R186S in Kombination mit Galectin-3-WT und ASF gemischt. Es wurden drei unterschiedliche Galectin-3-WT-Konzentrationen bei konstanter ASF-Konzentration gewählt, um unterschiedliche Zustände zu beschreiben, bei denen Galectin-3 nicht oligomerisiert (1 μM), kurz vor der Oligomerisierung steht (3 μM) und bei der definitiv eine Oligomerisierung stattfindet (20 μM). Die Konzentrationen wurden nach Abbildung 4-4 bestimmt. Als Ergebnis zeigte sich, dass unabhängig von der Konzentration von Galectin-3-WT oder Galectin-3_R186S keine bzw. keine stärkere Oligomerisierung detektiert werden konnte.

Lepur *et al.* konnten die Größe des Komplexes aus Galectin-3 und ASF mittels der dynamischen Lichtstreuung (DLS, s. 3.5.4) bestimmen. Hiernach ergab sich eine Größe von ca. 1 μm (Lepur *et al.*, 2012). Ergänzend dazu stellte sich die Frage, ob Galectin-3 ebenfalls mit freien Glykanen, die nicht an einem Protein gebunden waren, ähnlich große Cluster eingehen kann. Lactose als Disaccharid reichte nicht aus, um Galectin-3 zu oligomerisieren (Daten nicht gezeigt), allerdings führte der komplexere Zucker Lacto-N-neohexaose (LNnH), welcher natürlich vorkommt und eine höhere Affinität als Lactose zu Galectin-3 aufweist (Ahmad *et al.*, 2004b, Lepur *et al.*, 2012), zu einer Clusterbildung. Nach Titrierung zeigte sich, dass eine Mindestkonzentration von 17,5 μM LNnH nötig war, um ebenfalls 1 μm große Cluster bei einer Konzentration von 100 μM Galectin-3 zu induzieren (s. Abbildung 4-6). Dies entspricht einem Verhältnis von 5,7:1 (Galectin-3 zu LNnH), wohingegen unter optimalen Bedingungen ein Verhältnis von 1,6:1 bei einem Komplex aus Galectin-3-ASF ausreichte, um eine Oligomerisierung zu detektieren.

A)



B)



C)

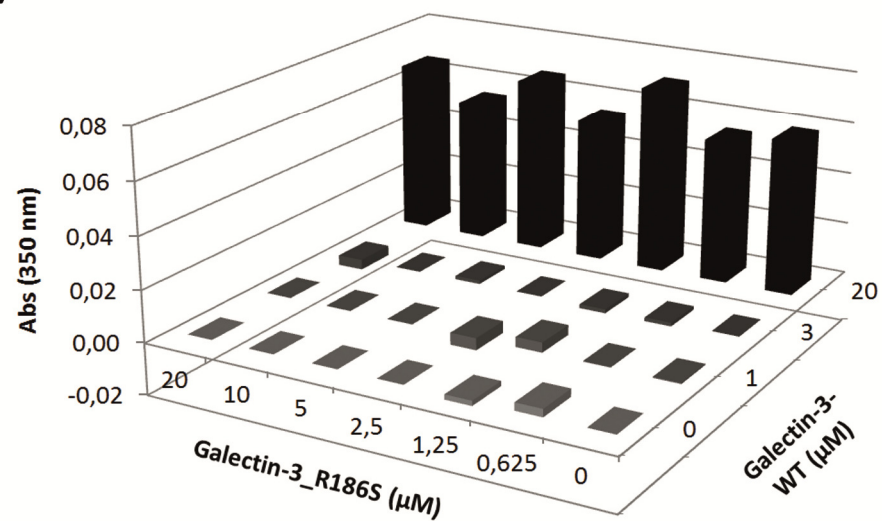


Abbildung 4-5 Oligomerisierungseigenschaften von Galectin-3 (Legende s. nächste Seite)

A) Kinetikmessungen der Oligomerbildung aus Galectin-3 und Asialofetuin bei einer Absorption von 350 nm. Jeweils 20 μM beider Proteine wurden miteinander gemischt und 2-3 Sekunden danach die Kinetik gestartet. Die Ermittlung des halbmaximalen Wertes (t_{halb}) wurde durch eine Nicht-lineare Regression mit Hilfe von GraphPad Prism bestimmt (schwarze Linie \pm Standardfehler, $n=3$). In **B)** wurden 20 μM Galectin-3 mit 10 μM ASF versetzt, gewartet bis eine Trübung mit dem Auge zu erkennen war und darauffolgend die Probe mit 15 mM Lactose vermischt. Die Messung erfolgte an einem Plattenlesegerät. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler ($n=3$). **C)** Ansteigende Konzentrationen von Galectin-3 R186S wurden mit Galectin-3-WT (20, 3, 1, 0 μM) gemischt. Anschließend wurden 10 μM ASF hinzupipettiert und die Absorption bestimmt.

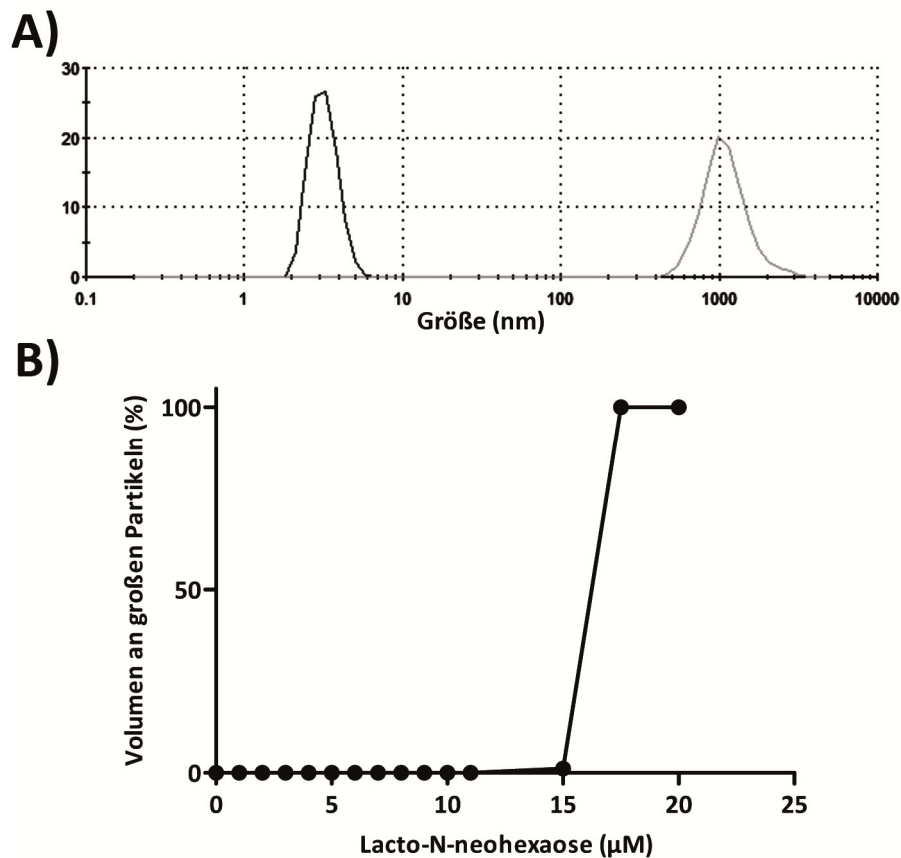


Abbildung 4-6 Größenbestimmung des Oligomers aus Galectin-3 und Lacto-N-neohexaose (LNnH)

Gemessen wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) von Galectin-3 nach Zugabe von LNnH. **A)** 100 μM Galectin-3 (schwarze Linie) wurden mit 20 μM LNnH (grau Linie) gemischt und sowohl die Größe der in Lösung befindlichen Partikel (X-Achse) als auch das prozentuale Volumen (Y-Achse) bestimmt. **B)** Zu sehen ist eine Titrationsreihe von LNnH in 100 μM Galectin-3, wobei das prozentuale Volumen an Partikeln mit einer Größe von über einem 1 μm dargestellt ist.

4.1.2 Bindungskinetiken von Galectin-3 zu unterschiedlichen Glykanen

Galectin-3 bindet über seine *carbohydrate recognition domain* unterschiedliche Arten von verzweigten Glykanen. Zur Beschreibung des Bindungsverhaltens von Galectin-3 zu seinen Liganden wurde die Fluoreszenzpolarisations (FP)-Methode (s. 3.5.2) verwendet. Vorteil dieser Methode ist ein Bindungsnachweis des Proteins in Lösung, der auf einer schnellen und sensitiven Messung mit geringem Einsatz an Protein beruhte. Abbildung 4-7 zeigt Bindungskurven von Galectin-3 zu unterschiedlichen Liganden (Lactose, A-Tetra: Fucosyl-N-Acetyl-Galactosamin-Lactose, SulfLac: sulfatierte Lactose und FucLac: Fucosyl-Lactose). Errechnet wurden anhand der Anisotropiewerte die Parameter A_0 , was für einen ungebundenen Liganden spricht, A_{\max} was auf die maximal-besetzten Bindungsstellen hindeutet und die Dissoziationskonstante K_d , welche die Affinität zwischen Ligand und Protein beschreibt, wobei ein niedriger K_d -Wert für eine starke Bindung des Liganden spricht. Demnach bindet Lactose schwächer an Galectin-3 als FucLac und FucLac wiederum schwächer als SulfLac. A-Tetra zeigt in dieser Ligandengruppe die höchste Affinität ($K_d < 1$). Vergleicht man FucLac zusammen mit A-Tetra, so ist die K_d von FucLac höher, allerdings A_{\max} von A-Tetra niedriger ($A_{\max_{\text{FucLac}}} = 204$, $A_{\max_{\text{A-Tetra}}} = 167$). Dies deutet darauf hin, dass FucLac als kleineres Molekül im Vergleich zu A-Tetra einen besseren Zugang zur Bindungstasche von Galectin-3 hat.

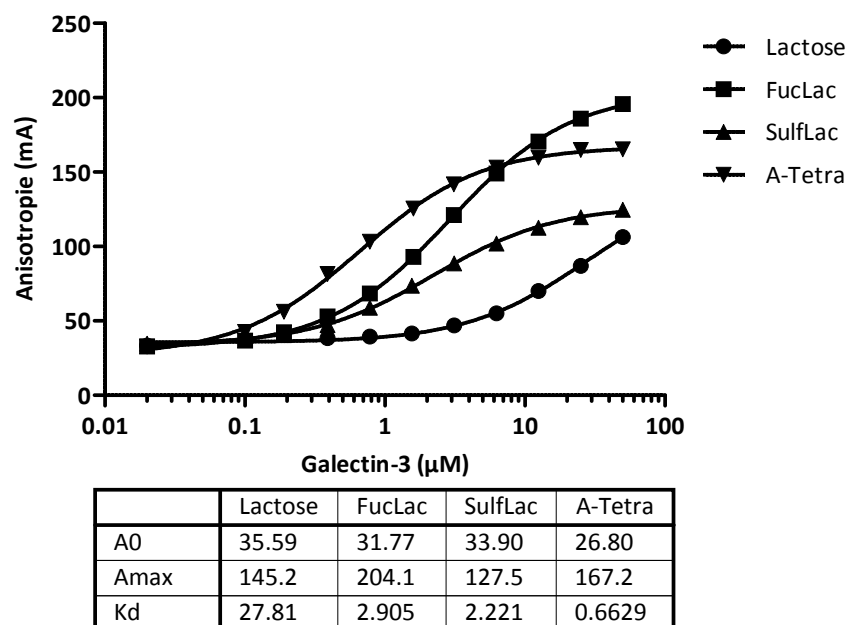


Abbildung 4-7 Bindungskinetiken von Galectin-3 zu unterschiedlichen Zuckern (Legende s. nächste Seite)

Dargestellt sind Bindungskinetiken von Galectin-3 mit den Zuckern Lactose, FucLac, SulfLac und A-Tetra mittels Fluoreszenzpolarisation. Die Konzentration der Liganden lag bei 0,1 μ M und Galectin-3 wurde in aufsteigender Konzentration hinzugegeben. Die Messung erfolgte direkt nach Zugabe des Proteins zu dem entsprechenden Zucker und wurde mit einem Pherastar FS Plattenlesegerät durchgeführt. Ebenfalls wurden die Werte A_0 , A_{max} und K_d anhand der Messwerte berechnet, in dem eine Kurve durchgelegt wurde, die sich den Messpunkten am besten anpasste (kalkuliert mit GraphPad Prism), s. besondere Erläuterungen 7.6 Punkt 1.

4.1.3 Verhalten von Galectin-3 in einem sauren Milieu

Die vorangegangenen Versuche bildeten die Grundlage, um das Verhalten von Galectin-3 in einer sauren Umgebung näher studieren zu können, wobei die Veränderung der Affinität und der Einfluss der Oligomerisierung auf die Affinität zum Liganden charakterisiert werden sollten. Dafür wurden zum einen der pH-Wert der Lösung, in der die Messung vorgenommen wurde, auf bis zu pH 4 erniedrigt und zum anderen zu den Messungen ASF gezielt hinzugegeben.

4.1.3.1 pH-abhängige Bindung von Galectin-3

Um eine pH-Abhängigkeit der Bindung von Galectin-3 zu einem Liganden zu untersuchen, wurde der Ligand A-Tetra gewählt. Dies ist ein einfach verzweigter Zucker, welcher in vorherigen Ergebnissen im Labor von Hakon Leffler (Universität Lund, Schweden) eine starke Bindung an Galectin-3 zeigte. In Abbildung 4-8 ist eine Titrationsreihe von Galectin-3 mit konstanten 0,1 μ M A-Tetra zu sehen. Des Weiteren wurde der pH schrittweise von 7,5 auf 4 gesenkt. Da der Puffer PBS unterhalb von pH 6 nicht stabil war, wurde für Werte unterhalb pH <6,5 ein Natriumacetat-Puffer verwendet. Galectin-3 band bei neutralem pH mit einer K_d von 1,11. Wurde der pH auf 6,5 gesenkt, stieg der K_d -Wert auf 1,30. Höhere K_d -Werte ergaben sich durch Messung bei pH 5 (K_d = 4,00) und 4 (K_d = 12,17), wobei A_{max} im Bereich zwischen 158,7 und 180,9 schwankte.

Wurde der Versuch mit dem Liganden Fucosyllactose (FucLac) wiederholt, zeigte sich ein ähnliches pH-abhängiges Verhalten. Allerdings bindet FucLac um das vier- bis fünffache schwächer an Galectin-3 als dies im Vergleich der Zucker A-Tetra tat (s. Abbildung 4-8).

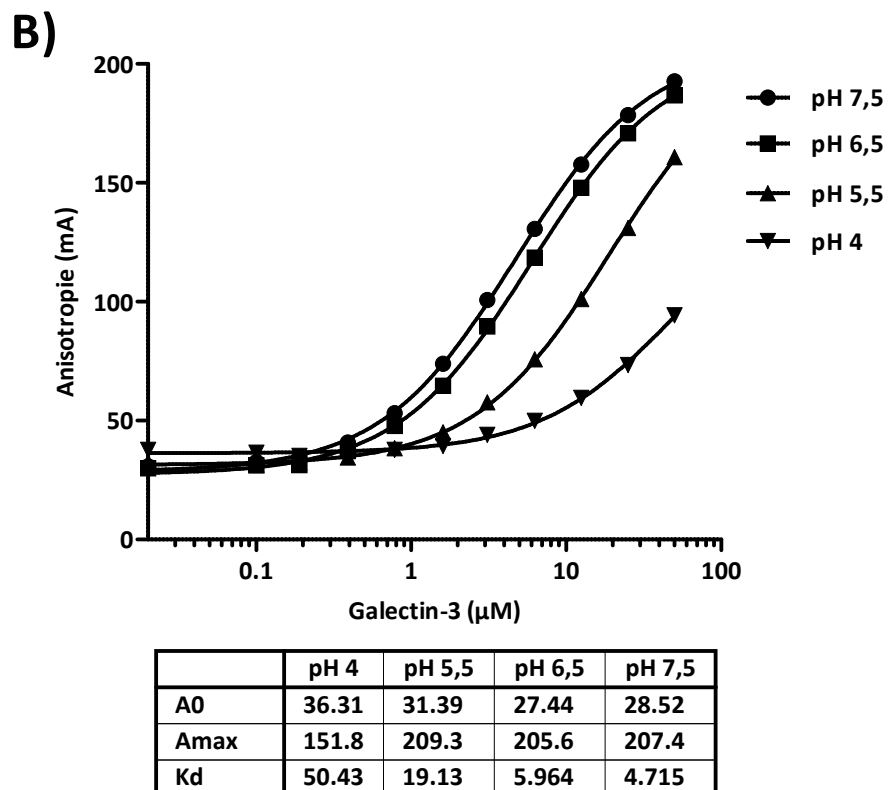
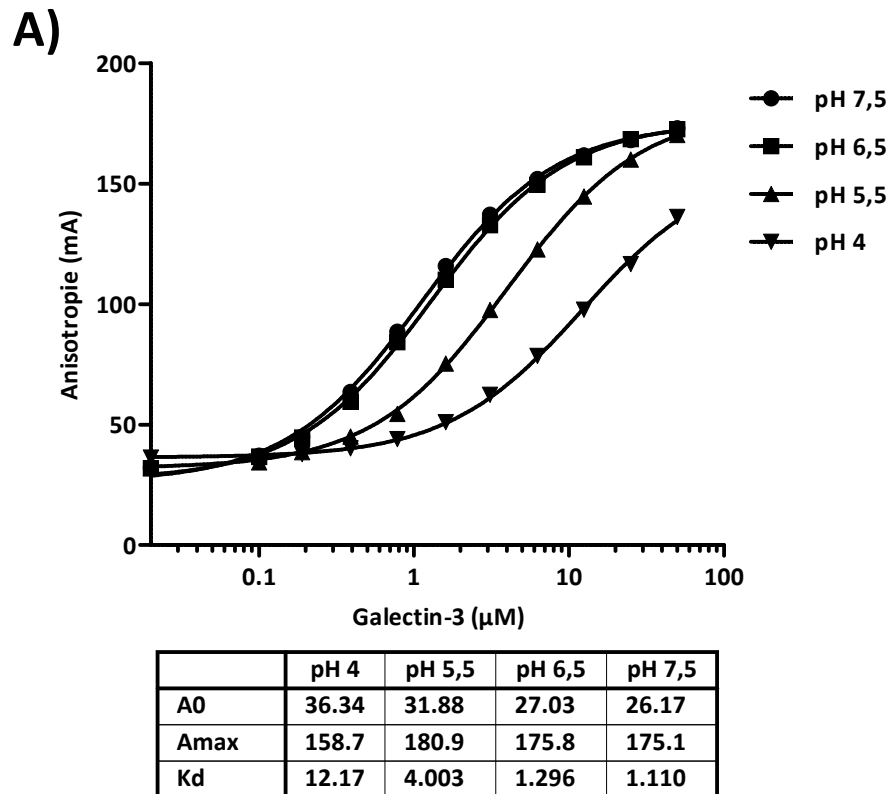


Abbildung 4-8 pH-abhängige Bindung von Galectin-3 an den Liganden A-Tetra und FucLac (Legende s. nächste Seite)

Dargestellt sind Bindungskinetiken von Galectin-3 mit den Zuckern A-Tetra **(A)** und FucLac **(B)** mittels Fluoreszenzpolarisation, die bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurden. Die Konzentration des Liganden lag bei 0,1 μM und Galectin-3 wurde in aufsteigender Konzentration hinzugegeben. Die Messung erfolgte direkt nach Zugabe des Proteins zu dem Zucker und wurde mit einem Pherastar FS Plattenlesegerät durchgeführt. Ebenfalls wurden die Werte A_0 , A_{max} und K_d anhand der Messwerte berechnet, in dem eine Kurve durchgelegt wurde, die sich den Messpunkten am besten anpasste (kalkuliert mit GraphPad Prism, $n=2$), s. besondere Erläuterungen 7.6 Punkt 1.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Sekundärstruktur des Proteins in dem gemessenen pH-Bereich änderte. Dafür wurde die Methode des Zirkulardichroismus (s. 3.5.3) gewählt, da hierbei geringe Mengen an Protein in Lösung vermessen werden konnten. Die gemessenen Daten bei neutralem pH sind vergleichbar mit veröffentlichten Daten von Bogoeva *et al.* (Bogoeva *et al.*, 2010). Es stellte sich heraus, dass die Sekundärstruktur im gemessenen pH-Bereich stabil blieb. Kleinere Schwankungen waren im Bereich von 220 nm zu erkennen ($\pm 0,7$ mdeg).

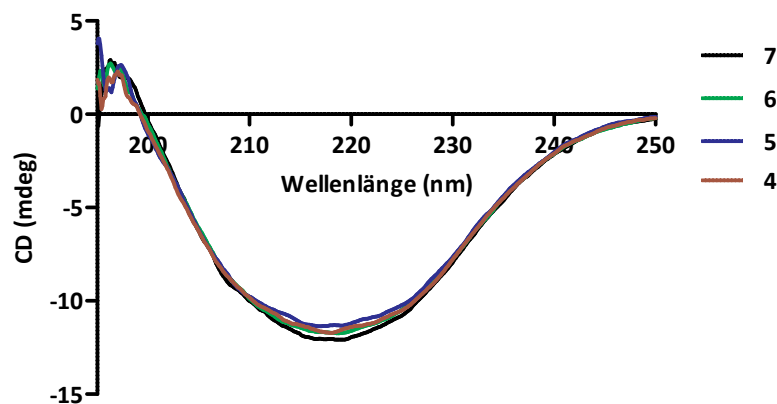


Abbildung 4-9 pH-abhängiges CD-Spektrum von Galectin-3

5 μM Galectin-3 wurden CD-spektrometrisch mit einem Gerät der Firma Jasco vermessen. Jede Messung stellt den gemittelten Wert aus drei aufeinanderfolgenden Datensätzen dar. Die Datenerhebung erfolgte mit einer Quarzküvette (1 mm Zelllänge) unter einer Abtastgeschwindigkeit von 50 nm/Minute. Die Temperatur lag konstant bei 20 °C.

4.1.3.2 pH-abhängige Oligomerisierung von Galectin-3

Um einen Effekt der Oligomerisierung auf die Affinität zu untersuchen, wurde die Streulichtmessung mit ASF (s. Abbildung 4-3) bei unterschiedlichen pH-Werten wiederholt. Es

zeigte sich, dass die Intensität der Oligomerisierung von Galectin-3 mit abfallenden pH sank. Die Unterschiede zwischen pH 7,5 und 6,5 variierten in Abhängigkeit der Galectin-3-Konzentration. Im Vergleich dazu unterschieden sich die Werte bei pH 5,5 stark zu denen von pH 7,5 (66 - 75%).

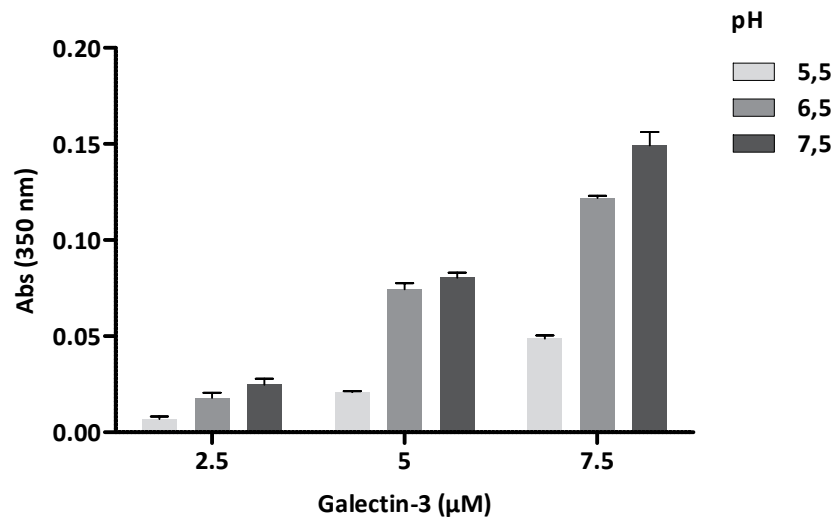


Abbildung 4-10 pH-abhängige Oligomerisierung von Galectin-3 mit ASF

Galectin-3 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5, 5 und 7,5 μM) mit 12,5 μM ASF vermischt und die Turbidität anhand eines Tecan M200 Plattenlesegerätes bei einer Absorption von 350 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messpunkten mit dem Standardfehler (SEM).

4.1.3.3 pH-abhängige Inhibition der Bindungskinetiken

Durch Kombination von FucLac und ASF in einer Messung mit Galectin-3 konnte der inhibitorische Effekt von ASF gemessen und kalkuliert werden. Diese Messungen wurden von Michael Carlsson im Labor von Hakon Leffler durchgeführt. Zusätzlich wurde dies mit der Probe A-Tetra durchgeführt. Es zeigte sich, dass konzentrationsabhängig ASF die Bindung zwischen Galectin-3 und A-Tetra bzw. FucLac inhibieren konnte. Mit diesen Daten konnten die Dissoziationskonstanten von ASF zu Galectin-3 berechnet werden (s. Abbildung 4-11). Um bei diesen Berechnungen die Bindung ohne den Einfluss der Oligomerisierung zu ermitteln, wurde die Konzentration von Galectin-3 zwischen 1 - 2 μM gehalten, da bei diesen Konzentration keine Oligomerisierung zu detektieren war (s. Abbildung 4-5).

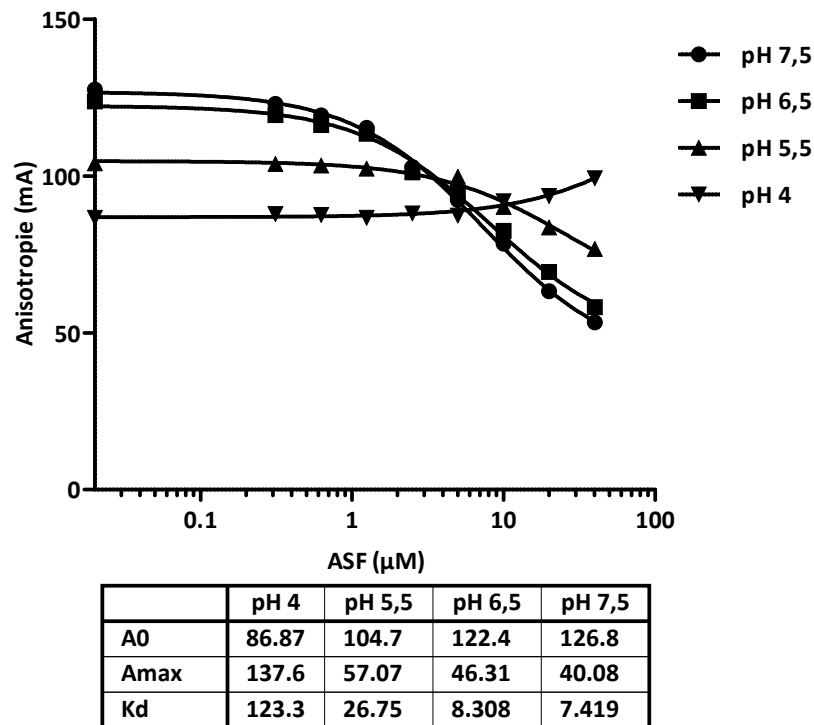


Abbildung 4-11 pH-abhängige Inhibition der Bindung zwischen Galectin-3 und A-Tetra mittels ASF

Ansteigende Konzentrationen an ASF wurden zu der Bindung zwischen Galectin-3 und A-Tetra hinzugegeben, um Kd-Werte von ASF mit Galectin-3 pH-abhängig zu bestimmen. Eingesetzte Mengen an Galectin-3 waren bei pH 7,5 und 6,5 1 μ M, bei pH 5,5 2 μ M und bei pH 4 5 μ M. A-Tetra wurde konstant bei 0,1 μ M gehalten. Die Messung erfolgte direkt nach Zugabe der Proteine zu dem Zucker und wurde mit einem Pherastar FS Plattenlesegerät durchgeführt. Ebenfalls wurden die Werte A0, Amax und Kd anhand der Messwerte berechnet, in dem eine Kurve durchgelegt wurde, die sich den Messpunkten am besten anpasste (kalkuliert mit GraphPad Prism, n=2), s. besondere Erläuterungen 7.6 Punkt 1.

In einem nächsten Schritt wurde die ASF-Konzentration konstant bei 10 μ M gehalten und Galectin-3 ansteigend hinzutitriert. Zu sehen sind mehrere Kurven, wobei die gepunkteten Werte gemessene Daten und die gestrichelten Linien theoretisch berechnete Daten darstellen. Des Weiteren ist in schwarz die Kinetik für Galectin-3 und FucLac dargestellt, wohingegen alle Daten, die in Anwesenheit von ASF erhoben wurden, in grau angezeigt werden. Die theoretischen Kurven wurden auf Grundlage des vorher gemessenen A0-, Amax- und Kd-Wertes kalkuliert. Hierbei diente folgende Gleichung als Grundlage:

$$y = A0 + (Amax - A0) \frac{x}{x + Kd}$$

Wobei

y = gemessener Anisotropiewert

A0 = Anisotropiewert (ungebundener Ligand)

Amax = maximaler Anisotropiewert (gebundener Ligand)

Kd = Dissoziationskonstante

x = Konzentration des Substrats (Protein)

ist.

Anhand dieser Gleichung wurde die Konzentration an freiem und gebundenen Galectin-3 berechnet und mit den real gemessenen Daten verglichen. In der einfachen Bindungskinetik zwischen Galectin-3 und FucLac passen die gemessenen Daten mit der berechneten Linie überein. Vergleicht man die gemessenen Daten der theoretischen Linien zusätzlich mit ASF in der Kinetik, so sieht man, dass ab 3 µM Galectin-3 die Werte beginnen, voneinander abzuweichen. Wurde nun der pH als vierter Parameter verändert, so entstand bei pH 6,5 ebenfalls eine Abweichung der Werte ab 3 µM Galectin-3, wobei keine Abweichung bei pH 5,5 detektiert wurde.

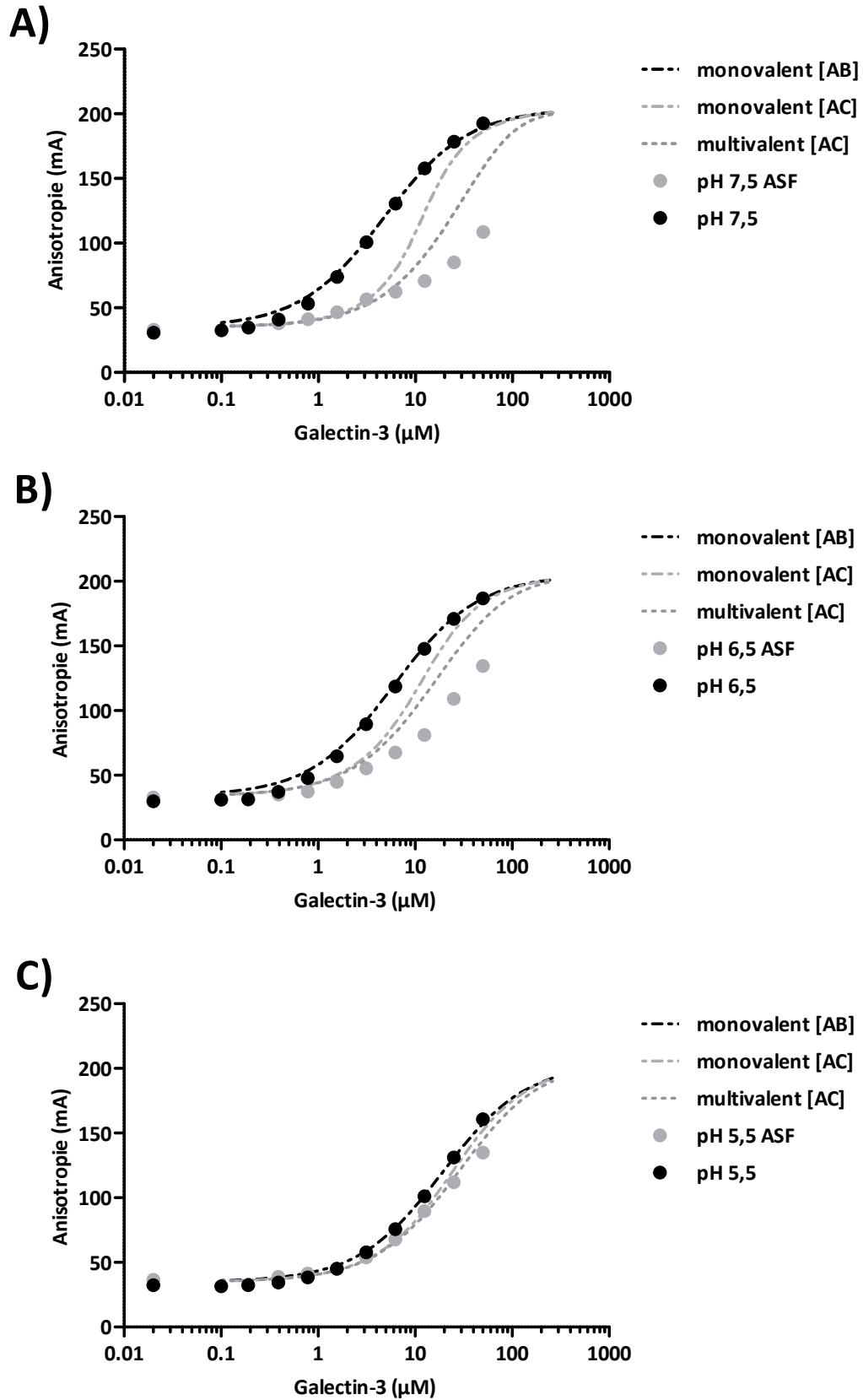


Abbildung 4-12 pH-abhängiger Einfluss der Oligomerisierung auf die Bindung von Galectin-3 zu seinem Liganden (Legende s. nächste Seite)

Galectin-3 wurde in aufsteigender Konzentration zu 0,1 μM FucLac bzw. falls markiert zu zusätzlich 10 μM ASF gemischt. Gemessen wurde bei pH 7,5 (**A**), 6,5 (**B**) und 5,5 (**C**). Die Messung erfolgte direkt nach Zugabe der Proteine zu dem Zucker und wurde mit einem Pherastar FS Plattenlesegerät durchgeführt, wobei die schwarzen Punkte Messungen ohne ASF und graue Punkte Messungen mit ASF darstellen. Die gestrichelten Linien beruhen auf berechneten Werten, die auf Grundlage der zuvor bestimmten A_0 -, A_{max} - und K_d -Werte von ASF und FucLac bestimmt wurden. Hierbei wurde eine theoretisch mögliche monovalente als auch eine multivalente Bindung von Galectin-3 an ASF berücksichtigt (A - Galectin-3, B - FucLac und C - ASF). Schwarze Linien beziehen sich auf die Bindung zwischen Galectin-3 und FucLac und graue Linien beziehen sich auf die Bindung zwischen Galectin-3, FucLac und ASF, s. besondere Erläuterungen 7.6 Punkt 1.

4.2 Etablierung eines Vesikellmodells aus einer nativen Zellmembran

Galectin-3 interagiert mit der apikalen Plasmamembran von MDCK II Zellen über glykosidische Wechselwirkungen. Diese Glykane sind auf Proteinen oder Lipiden zu finden und sind meist komplex-verzweigt, welches nicht bzw. schwer in einem Modellsystem nachzuahmen ist. Auf der anderen Seite ist die Zelle als Modell für Interaktionsstudien nur bedingt geeignet, da in der Mikroskopie nicht zwischen äußeren und inneren Membranen zu differenzieren ist, wodurch Quantifizierungen erschwert möglich sind. Daher wurde ein Vesikellmodellsystem etabliert, das die Interaktion von Galectin-3 zu komplexen Glykanen in einer nahezu nativen Membran visualisiert und quantitativ wiedergeben konnte. Hierfür wurde das Modell der *giant plasma membrane vesicles* (GPMVs) als Grundlage verwendet (Baumgart *et al.*, 2007) und die Bedingungen zur Isolation für MDCK II Zellen angepasst.

4.2.1 Grundlagen zur Isolierung von GPMVs aus MDCK II Zellen

Zur Isolation von GPMVs aus MDCK II Zellen wurden zwei Protokolle angewandt, wobei das erste auf einer Paraformaldehyd-Isolation (PFA) und das zweite auf einer N-ethylmaleimid-Isolation (NEM) beruhte (s. 3.3.2.1). Die PFA-Isolation wurde nach Baumgart *et al.* und die NEM-Isolation nach Levental *et al.* angepasst. Beide Protokolle wurden dahingehend optimiert, dass die Zellen während der Isolation nicht bei 60 rpm/min geschüttelt wurden, da sich die Zellen aus ihrem Verband gelöst hatten. Des Weiteren wurden 4 mM statt 2 mM NEM eingesetzt, um die Anzahl der Vesikel zu erhöhen. Es reichte daher für MDCK II Zellen aus, sie 30 - 60 min bei 37 °C mit der entsprechenden Substanz zu inkubieren. Ebenfalls wurde die Isolation bei HeLa Zellen angewandt, wobei die Inkubationszeit auf bis zu 12 h erhöht wurde, um die Vesikelbildung zu verstärken. Abbildung 4-13 zeigt MDCK II Zellen vor und nach Behandlung mit der PFA-Isolationmethode. Ebenfalls sind die Vesikel einzeln dargestellt. Die

Zellen wiesen nach Behandlung eine teilweise starke Deformation auf, wobei zu erkennen war, dass der Verband nicht durch die Behandlung aufgelöst wurde.

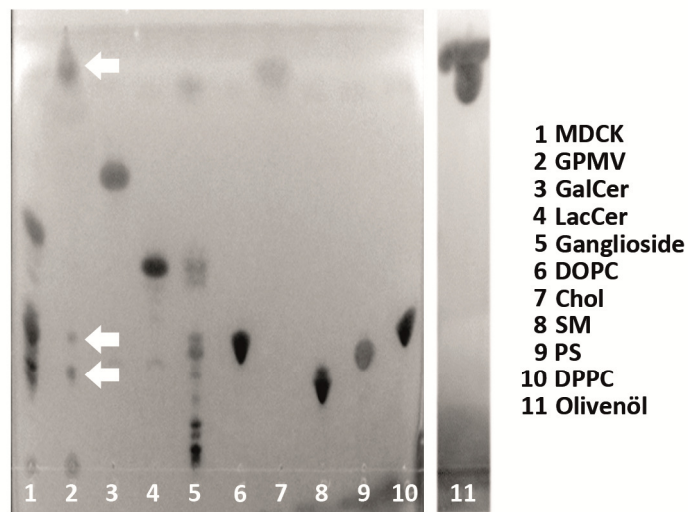
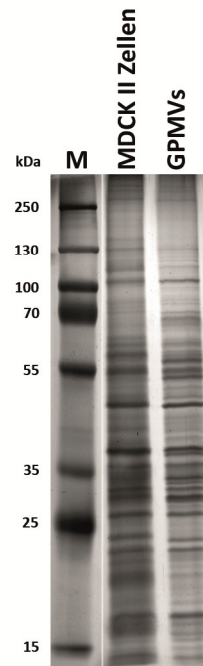
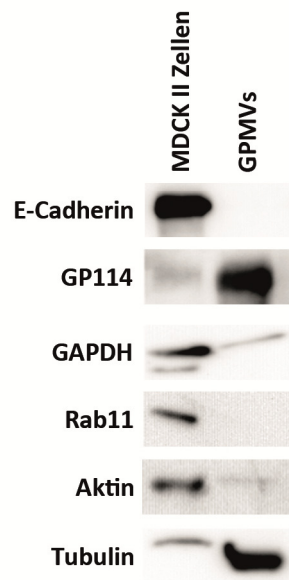


Abbildung 4-13 Digitale Fotografie von MDCK II Zellen und GPMVs

MDCK II Zellen wurden nach der PFA-Isolierungsmethode behandelt und einmal vor und nach Isolation fotografiert (links und Mitte). Das rechte Bild zeigt die GPMVs nach Isolation. Die Bilder entstanden mit einer Digitalkamera, die auf ein Okular eines Lichtmikroskops gesetzt wurde, welches ein Objektiv mit 20facher Vergrößerung hatte.

4.2.2 Zusammensetzung von GPMVs aus MDCK II Zellen

Die Vesikel wurden zu Beginn auf ihre Lipid- und Proteinzusammensetzung hin untersucht. Hierfür wurden die Lipide mittels der Folch-Methode (s. 3.4.2) extrahiert und in der Dünnschichtchromatographie mit Standardlipiden verglichen. Es stellte sich heraus, dass GPMVs aus MDCK II Zellen angereichert an Dipalmitoylphosphatidylcholinen, Cholesterol, Gangliosiden und Triglyceriden waren (s. Abbildung 4-14A). Ein Proteomvergleich mit Hilfe einer Silberfärbung ergab, dass kein bestimmtes Protein vermehrt vorkam. Wurde allerdings mittels Antikörpern spezifisch nach einem Protein gesucht, konnten einige Unterschiede in der Proteinzusammensetzung festgestellt werden. Vermindert zu finden waren GAPDH und Aktin, wohingegen Tubulin und der apikale Marker gp114 verstärkt auftraten. Der basolaterale Marker E-Cadherin und der apikal-endosomale Marker Rab11 konnten hingegen im Vergleich zum MDCK II Zelllysate nicht in GPMVs nachgewiesen werden (s. Abbildung 4-14).

A)**B)****C)****Abbildung 4-14 Zusammensetzung von GPMVs**

A) Analyse des Lipidlysats von MDCK II Zellen (1) und deren GPMVs (2) nach Extraktion mittels der Folch-Methode. Als Standard wurden Galactosylceramid (3 - GalCer), Lactosylceramid (4 - LacCer), Ganglioside (5 - Gemisch aus Nervenzellen), Diolelphosphatidylcholin (6 - DOPC), Cholesterol (7 - Chol), Sphingomyelin (8 - SM), Phosphatidylserin (9 - PS), Dipalmitoylphosphatidylcholin (10 - DPPC) und Olivenöl (11 - Gemisch aus Triglyceriden) verwendet. Die Isolation der GPMVs erfolgte nach der PFA-Isolationsmethode und die Lipide wurden mittels DC in einem Gemisch aus Isopropanol/Methanol und 0,2% CaCl_2 (40/7/20 vol%) aufgetrennt. Die weißen Pfeile deuten auf angereicherte Lipide in der GPMV-Fraktion. **B)** Darstellung einer Silberfärbung von MDCK II- und GPMV-Lysat; die Proben wurden auf einem 12 % SDS-Gel aufgetragen und nach dem Lauf angefärbt. Die Entwicklung erfolgte bis eine Bandenfärbung zu erkennen war. **C)** Detektion unterschiedlicher Proteine eines MDCK II- im Vergleich zu einem

GPMV-Lysat aus derselben Zelllinie. Nachgewiesen wurden E-Cadherin, GP114, GAPDH, Rab11, Aktin und Tubulin. Die Entwicklung erfolgte mit Luminol (Dura, 1:1 in PBS) zwischen 5 und 300 Sekunden.

4.2.3 Verwendung von GPMVs für mikroskopische Analysen

Zur Visualisierung von Membranen unter einem Fluoreszenzmikroskop werden klassischer Weise *giant unilamellar vesicles* (GUVs) verwendet, da diese mehrere Mikrometer groß sind. Die Fluoreszenzfärbung erfolgt hierbei meist mit einem Lipid, das während der Präparation der Vesikel hinzugegeben wird. Dieses galt es in den ersten Versuchen zur Visualisierung von GPMVs nachzubauen und dabei die Größe der Vesikel zu spezifizieren und geeignete Fluorophore zu bestimmen. Es stellte sich empirisch heraus, dass der Hauptteil der Vesikel eine Größe zwischen 5 und 20 μm aufwies. Diese konnten wiederum gut mikroskopiert werden und waren leicht mittels Phasenkontrast auf der Oberfläche eines Deckglases zu detektieren. Für fluoreszierende Aufnahmen wurden zwei Markierungsarten gewählt, wobei beide auch kombiniert werden konnten. Zum einen wurden fluoreszierende Lipide verwendet, die zu den Vesikeln hinzupipettiert wurden und zum anderen konnten zuvor transfizierte Fusionsproteine mit einem *green fluorescent protein* (GFP) als Vesikelmarker verwendet werden. Bei den Lipiden zeigte sich, dass eine Markierung nach der Isolation effizienter war als vor der Isolation, da mit geringerem Einsatz an Fluorophor gearbeitet werden konnte. Hierfür konnte auf ein weites Spektrum kommerziell erhältlicher Lipide zurückgegriffen werden. GFP als fluoreszierendes Protein erwies sich als starker intraluminärer Marker und wurde daher für Kontrollen verwendet. Zu Visualisierung der Membran durch ein Protein wurden Fusionsproteine aus dem zu untersuchenden Membranprotein und einem GFP als Vesikelmarker verwendet. Dies bildete die Grundlage, um Galectin-3 Membraninteraktionen studieren zu können.

Auf Grundlage dieser zwei Markierungsmethoden konnten GPMVs im Epifluoreszenzmikroskop und unter KLSM beobachtet werden. Ebenfalls konnten GPMVs mit hochauflösenden Mikroskopen (GSDIM) beobachtet werden, wobei der Untergrund und das Fluorophor in einer Weise modifiziert wurden, dass es für die GSDIM-Methode geeignet war. Es wurden ausschließlich YFP-markierte Proteine zur Vesikelmembranmarkierung verwendet und der Deckglasboden zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nach Beachtung dieser Modifizierungen konnte die Auflösungsgrenze von 350 - 400 nm in der Epifluoreszenz- auf 50 - 60 nm in der GSDI-Mikroskopie reduziert werden (s. Abbildung 4-15).

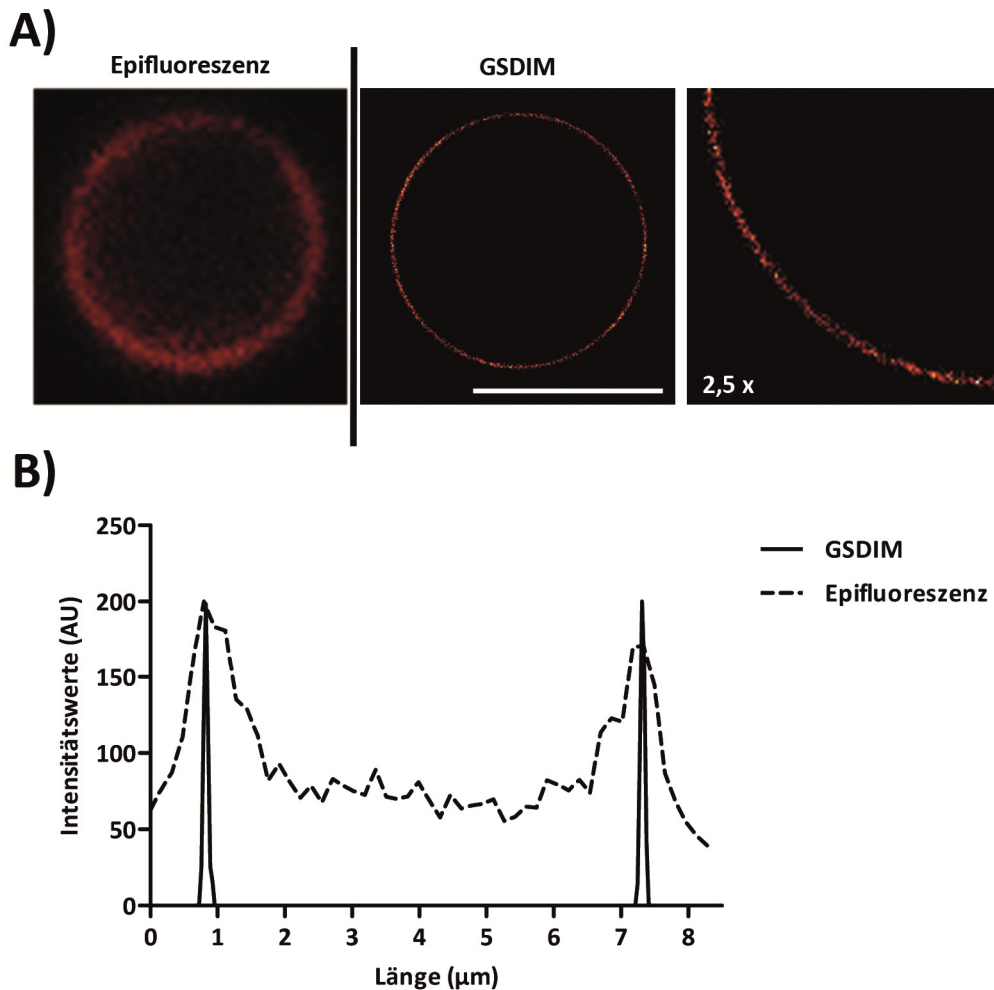


Abbildung 4-15 Fluoreszenzmikroskopie mit GPMVs

A) Zu sehen sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Vesikel isoliert aus MDCK II Zellen. Die Zellen exprimierten stabil GPI-YFP und die Isolation erfolgte mittels der NEM-Isolationsmethode. Die Aufnahmen wurden an einem GSDIM-Mikroskop aufgenommen, wobei die Anregung in einem Gemisch aus Glucoseoxidase, Glucose und Mercapto-Cysteamin (MEA) stattfand. Das rechte Bild zeigt den linken unteren Abschnitt des mittleren Bild in einer 2,5x Vergrößerung. **B)** Dargestellt sind Intensitätsprofile des Vesikels in **A)**, das einerseits unter Epifluoreszenz (gestrichelt Linie) und andererseits unter GSDIM (durchgehende Linie) aufgenommen wurde. Erstellt wurde das Profil mit ImageJ in der Version 1.46r.

4.2.4 Verwendung von GPMVs im Durchflusszytometer

Um Aussagen, die mit GPMVs erlangt wurden, mit quantifizierbaren Messungen zu bestätigen, wurden GPMVs für die Durchflusszytometrie etabliert. Hierfür wurden als Kontrollen fluoreszierende Proteine gewählt, die im Lumen des Vesikels saßen, da man bei einem Membranprotein ein positives Signal nicht zwischen einem zerplatzten und einem intakten Vesikel unterscheiden konnte. Des Weiteren wurden nur solche Signale ausgewertet, die einen

gewissen Schwellenwert an Fluoreszenzintensität überschritten hatten. Als Kontrollprotein, das sich im Lumen der Vesikel befand, wurde Flotillin-1-YFP verwendet, welches als membranassoziertes Protein deklariert ist, allerdings durch die Isolation der Vesikel im Lumen zu finden war. Bestimmt wurde der Schwellenwert mit Hilfe einer Negativkontrolle, bei der die Vesikel mit einem Detergenz behandelt wurden, wodurch das luminale Protein aus dem Vesikel herauskam und nur schwach im Durchflusszytometer messbar war. Somit konnte auf solche Fraktionen eingegrenzt werden, die keine Fluoreszenz in der Negativkontrolle aufwiesen, allerdings ein Signal in der Positivkontrolle ergaben (s. Abbildung 4-16).

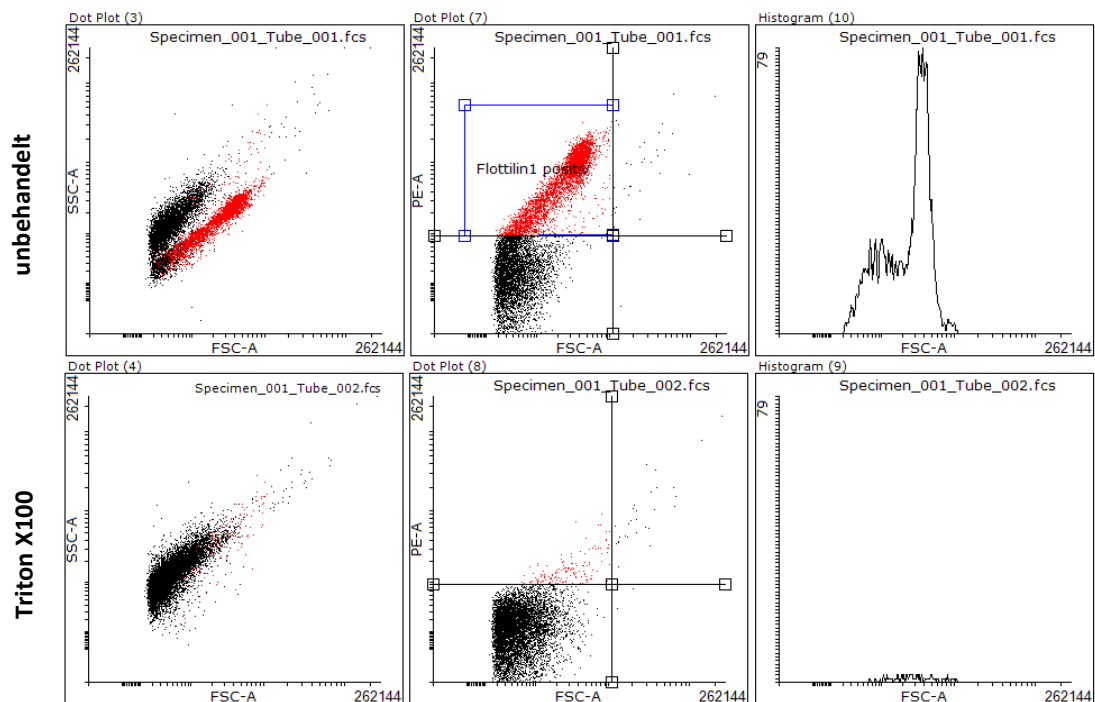


Abbildung 4-16 Durchflusszytometrische Bestimmung von GPMVs

Zu sehen sind Vesikel aus MDCK II Zellen, die Flotillin-1-YFP stabil exprimierten und mit der PFA-Isolationsmethode gewonnen wurden. Die Messung erfolgte mit einem Durchflusszytometer FACSCanto II (BD Biosciences) und stoppte jeweils nach 10.000 Ereignissen. Detektiert wurden der FSC (*forward scatter*), der SSC (*side scatter*) und die Fluoreszenz PE (Anregung von Fluorophoren im gelben Bereich wie YFP). Die Proben wurden entweder unbehandelt (obere Bildzeile) oder behandelt mit 1 % Triton X-100 (untere Bildzeile) für die Messung vorbereitet. Dargestellt sind alle Ereignisse (schwarz) und solche Ereignisse, die positiv selektioniert (rot) und für spätere Messungen verwendet wurden. In der ersten Spalte sind FSC versus SSC, in der mittleren Spalte FSC versus PE aufgetragen und in der letzten Spalte ist ein Histogramm des FSC der positiv-selektionierten Ereignisse zu sehen.

4.2.5 Phasenseparationen

Eine wichtige Eigenschaft von Membranen ist die Fähigkeit Phasen zu bilden. Lipide mit ähnlichen Eigenschaften können sich zusammenlagern und zu bestimmten Arealen in der Membran ansammeln. Membranproteine lagern sich abhängig ihrer Transmembrandomäne

und dazu assoziierten Domänen in diese Areale ein und kommen somit in der Membran in konzentrierten Foci vor. Dies kann Signalwege anschalten oder Endozytosevorgänge fördern. Daher wurde die Fähigkeit der Phasenseparation in GPMVs näher spezifiziert (Pierce 2002, Holowka *et al.*, 2005). Baumgart *et al.* konnten vorher in HeLa-Zellen Separationen mit dem Lipid RH-DOPE illustrieren (Baumgart *et al.*, 2007).

Um eine Phasenseparation nachweisen zu können, wurden die GPMVs mit unterschiedlichen Lipiden nach Isolation behandelt. Eine Aufstellung der Lipide mit Konzentrationsangaben siehe Tabelle 3-4. Es wurden sowohl Lipide einzeln oder in Kombination mit GFP-markierten Proteinen untersucht. Es zeigte sich, dass GPMVs aus MDCK II Zellen Phasenseparationen ausbilden konnten. Hierbei sortierte sich der *Liquid disordered* (Ld)-Marker RH-DOPE (Rhodamin-Dioleylphosphatidylethanolamin) in entgegengesetzten Arealen als der *Liquid ordered* (Lo)-Marker Naphthopyren. Des Weiteren wurde das Protein p75-GFP, das mit Galectin-3 assoziiert, in den gleichen Arealen wie RH-DOPE ankonzentriert. GPI-YFP hingegen reicherte sich in entgegengesetzten Arealen der Membran an (s. Abbildung 4-17).

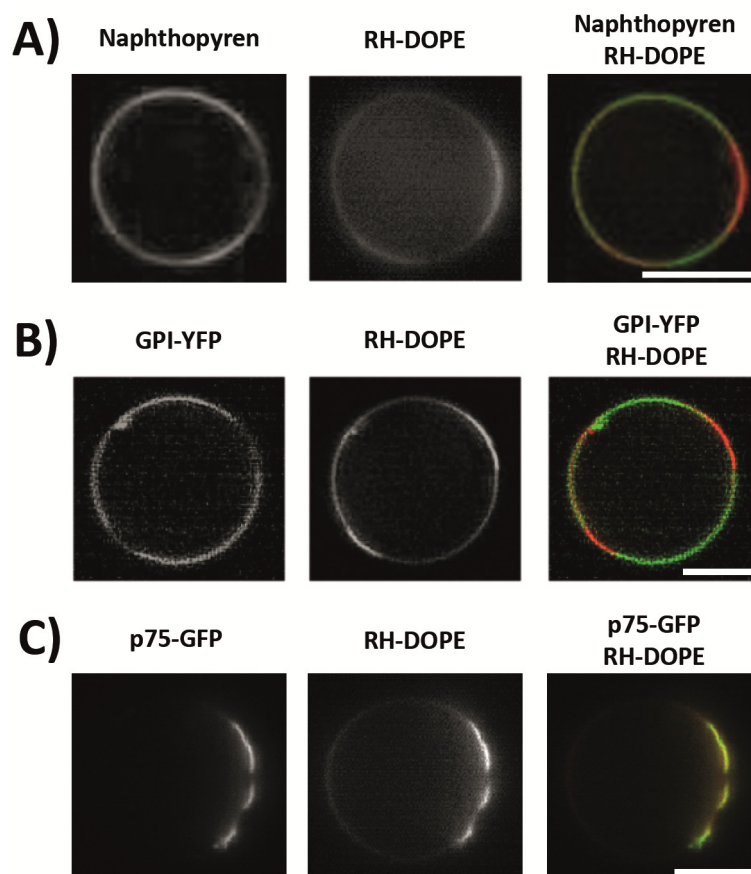


Abbildung 4-17 Phasenseparation von GPMVs (Legende s. nächste Seite)

Die Isolation der Vesikel erfolgte nach der PFA-Isolationsmethode aus MDCK II Zellen, die kein bzw. die Proteine GPI-YFP oder p75-GFP stabil exprimierten. Zusätzlich wurden die Vesikel mit RH-DOPE (**A**, **B** und **C**) bzw. mit Naphthopyren (**A**) behandelt und bis kurz vor der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme auf 4 °C gekühlt. Die Bilder entstanden in der Äquatorialebene jedes Vesikels. Maßstab 5 µm

4.3 Membraninteraktionen von Galectin-3

Galectin-3 interagiert in der Zelle mit Glykanen, die an Proteinen und Lipiden kovalent gebunden sind. Diese Glykane sind komplex und mehrfach verzweigt und können nicht oder nur teilweise synthetisiert werden. Daher wurde das Modell der GPMVs aus MDCK II Zellen etabliert, um Interaktionen von Galectin-3 mit einer annähernd nativen Membran nachzuahmen. Im Folgenden werden Ergebnisse gezeigt, die aufbauend auf Abschnitt 4.1 und 4.2 durchgeführt wurden.

4.3.1 Bindungseigenseigenschaften zu GPMVs

Zu Beginn wurden die Bindungseigenschaften von Galectin-3 an GPMVs mittels durchflusszytometrischen Messungen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass Galectin-3 konzentrationsabhängig an die Vesikel bindet. Ebenfalls konnte durch Zugabe von Lactose die Bindung konzentrationsabhängig inhibiert werden (s. Abbildung 4-18).

Delacour *et al.* zeigten, dass Galectin-3 mit dem Neurotrophinrezeptor p75 in MDCK II Zellen interagiert, welches über einen *lipid raft*-unabhängigen Transportweg zur apikalen Seite von MDCK II Zellen transportiert wird (Delacour *et al.*, 2007). Darüber hinaus spezifizierten Straube *et al.*, dass die Aufnahme mittels Endozytose über *lipid-raft*-abhängige Wege stattfindet (Straube *et al.*, 2013). Weitergehend wurde daher untersucht, mit welchen Strukturen Galectin-3 in GPMV-Membranen assoziiert. Verwendet wurden die Marker Glykosylphosphatidylinositol-CFP (GPI-CFP) und Rhodamin-Diolelphosphatidylethanolamin (RH-DOPE), welche als *lipid-raft*-abhängige bzw. -unabhängige Marker gelten (Baumgart *et al.*, 2007). Galectin-3 assoziierte hierbei mit RH-DOPE, wohingegen GPI-CFP in entgegengesetzten Membranarealen verstärkt vorkam (s. Abbildung 4-19).

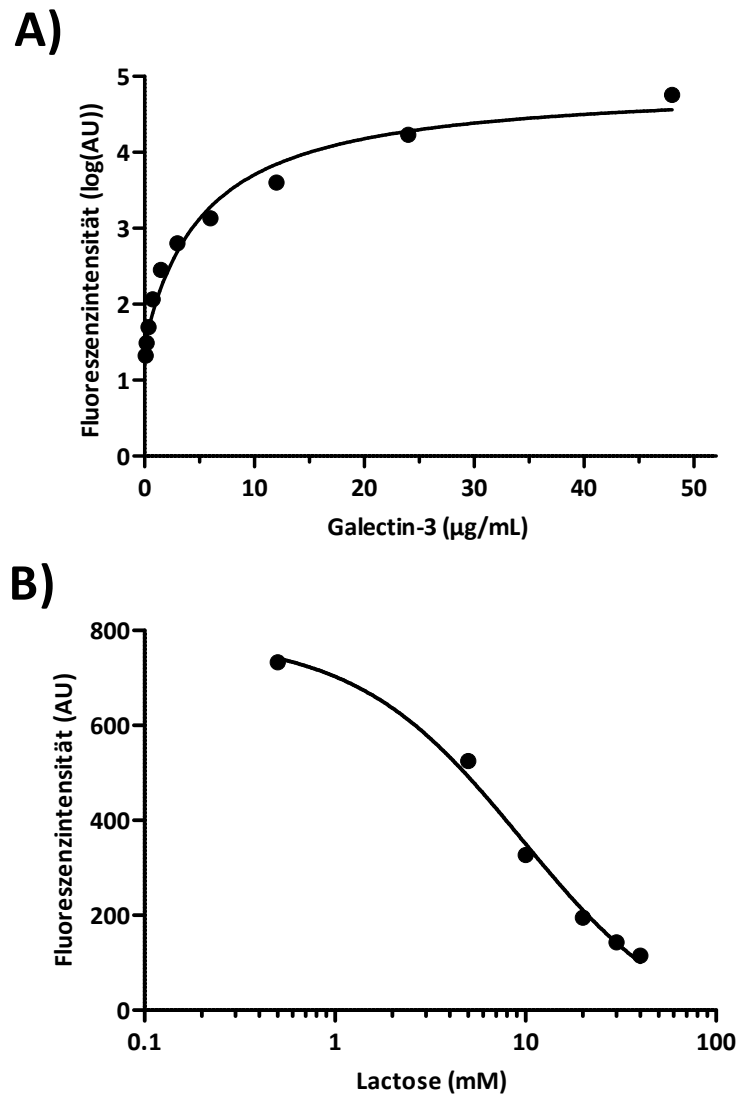


Abbildung 4-18 Membraninteraktionen von Galectin-3 mit GPMVs

Dargestellt sind Bindungskinetiken von Galectin-3-Alexa647 an GPMVs. In **A)** wurde Galectin-3-A647 in aufsteigender Konzentration hinzugegeben und in **B)** wurde bei konstant 1 µM Galectin-3-Alexa647 Lactose in aufsteigender Konzentration hinzugegeben. Die GPMVs wurden mittels der PFA-Isolationsmethode gewonnen und vor der Zugabe mit Galectin-3-A647 in 1 % BSA geblockt. Die Messung in dem Durchflusszytometer wurde nach 10.000 - 20.000 Ereignissen gestoppt und die gemittelten Werte für eine Nicht-lineare Regression mit GraphPad Prism ausgewertet.

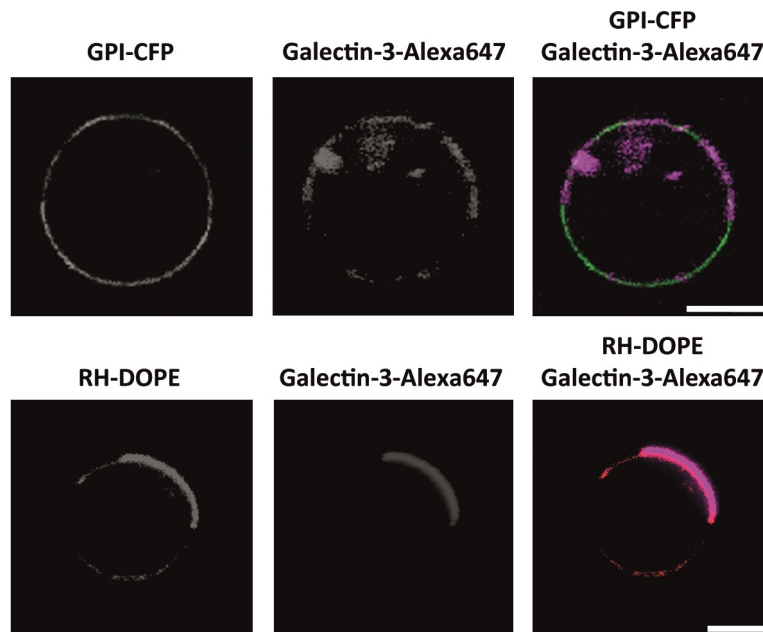


Abbildung 4-19 Assoziation von Galectin-3 mit *lipid-rafts*

GPMVs wurden aus MDCK II Zellen isoliert und mit 1 μ M Galectin-3-Alexa647 für eine Stunde inkubiert. Im Falle von GPI-CFP exprimierten die Zellen stabil das Protein, wohingegen das Lipid RH-DOPE nach Isolation zu den Vesikeln hinzugegeben wurde. Die Aufnahmen erfolgten mit einem KLS-Mikroskop in der Äquatorialebene des Vesikels. Maßstab 5 μ m

Um den Einfluss von Lipiden auf die Bindung von Galectin-3 an die apikale Membran zu charakterisieren, wurden GPMVs einerseits mit Proteinase K und andererseits mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) inkubiert. Proteinase K ist eine Serinprotease, die effizient Proteine in den GPMVs spalten konnte. M β CD zieht gezielt Cholesterol aus der Membran und senkt damit die Cholesterolkonzentration in den Vesikeln. Beide Substanzen führten zu einer Senkung der Bindungsintensität von Galectin-3 an die Membran, wobei der Effekt durch Zugabe beider Substanzen addiert werden konnte. Interessant war hierbei zu beobachten, dass die Bindung durch Zugabe von Proteinase K nicht komplett inhibiert wurde, was einen Hinweis auf nicht-proteinogene Liganden gab.

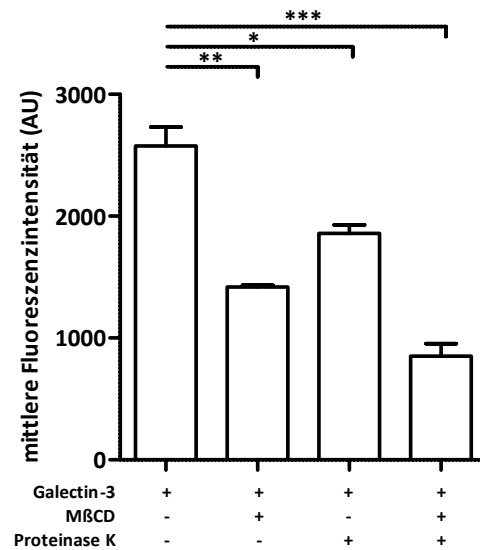


Abbildung 4-20 Beeinflussung der Bindung von Galectin-3 an GPMVs durch Proteinase K und MβCD

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität von 0,4 μ M Galectin-3-A647 an GPMVs, die zuvor mit 0,01 mg/mL Proteinase K, 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin (MβCD) oder beidem behandelt wurden. Die Messung erfolgte mit einem Durchflusszytometer, wobei 10.000 Ereignisse bewertet wurden. Die Auswertung wurde mittels einer einfaktoriellen ANOVA gefolgt von einem Tukey-Post-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.3.2 Inter-spezifische Adhäsion zweier Membranen durch Galectin-3

Galectin-3 zeigte konzentrationsabhängig zwei Effekte, die mit GPMVs visualisiert werden konnten. Unterhalb einer Konzentration von 1 μ M konnte es Proteine wie p75-GFP in der Vesikelmembran anreichern (s. 4.3.3), wurde die Konzentration allerdings erhöht, wurden weitergehend Liganden zwischen zwei Vesikeln mit einander verbunden (inter-spezifisch). Es entstanden damit Vesikel die unilamellär (ULV - unilamelläre Vesikel) und welche die multilamellär waren (MLV - multilamelläre Vesikel). Diese Vesikel konnten im Durchflusszytometer durch ein verändertes Seitwertsstreulicht (*side scattering* SSC) unterschieden werden, wobei mit steigender Konzentration an Galectin-3 die Anzahl an MLVs zunahm und gleichzeitig die Anzahl von ULVs abnahm. Im Mittel stieg der SSC von 2,1 bei unbehandelten Proben auf 6,2 (log SSC) bei Galectin-3-inkubierten Proben an (s. Abbildung 4-21). Diese Messungen wurden mit PFA-isolierten Vesikeln durchgeführt.

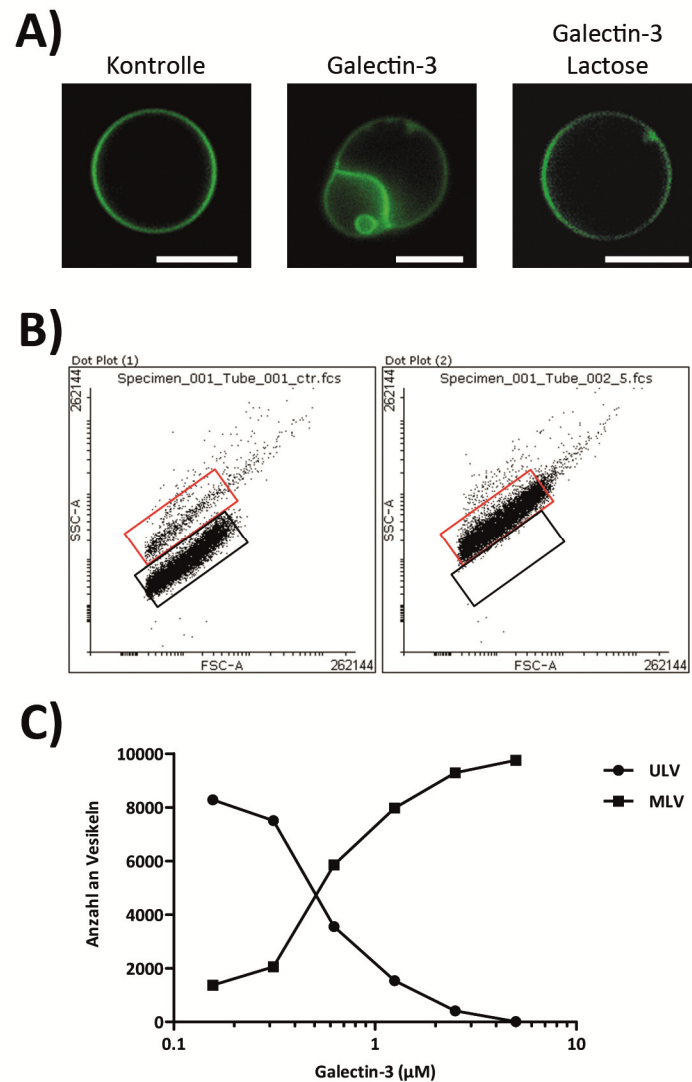


Abbildung 4-21 Galectin3-vermittelte GPMV - GPMV-Adhäsionen

A) GPMVs wurden aus MDCK II Zellen isoliert, mit OrgeonGreen PE versetzt und für 30 min mit 13 μM Galectin-3 oder zusätzlich mit 75 mM Lactose inkubiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Epifluoreszenzmikroskop in der Äquatorialebene des Vesikels. Maßstab 5 μm **B)** GPMVs wurden für 30 min mit 5 μM Galectin-3 inkubiert und im Durchflusszytometer der FSC (X-Achse) versus des SSC (Y-Achse) bestimmt. Insgesamt wurden 10.000 Ereignisse gemessen. Das schwarze Quadrat zeigt einzelne GPMVs (unilamellare Vesikel - ULV) und das rote Quadrat zeigt adhärierte GPMVs (multilamellare Vesikel - MLV) an. **C)** Galectin-3 wurde in aufsteigender Konzentration für 30 min mit GPMVs versetzt und anschließend mit einem Durchflusszytometer ausgewertet. Dargestellt ist die Anzahl der Vesikel die im schwarzen (ULV) bzw. roten Quadranten (MLV) detektiert wurden.

4.3.3 Intra-spezifische Membrancluster von Galectin-3

Als nächstes galt es die Interaktion von Galectin-3 mit spezifischen Markern in der Membran (intra-spezifisch) zu charakterisieren. Dazu wurden Proteine stabil in die MDCK II Zelllinie transfiziert, die mit einem GFP-Protein fusioniert waren. Ebenfalls wurden unterschiedlich

fluoreszierende Lipide verwendet, die nach der GPMV-Isolation mit diesen inkubiert wurden. Nach Zugabe von 1 μM Galectin-3 wurden die Vesikel mittels eines KLSM analysiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Äquator der Vesikel aufgenommen wurde, da es in diesem die schärfste Fokussierungsebene gab.

4.3.3.1 Membrancluster mit unterschiedlichen Markern

Nach Inkubation mit Galectin-3 wurde festgestellt, dass einige Marker sich in Foci des Vesikels anreicherten. Dieser Effekt grenzte sich dahingehend von einer Phasenseparation ab, dass die Anreicherung nicht über große Bereiche des Vesikels geschah (im Vergleich dazu s. 4.2.5), sondern punktförmig vorzufinden war. Dies konnte mit p75-GFP und GPI-YFP wie auch RH-DOPE und Naphthopyren beobachtet werden. Im Fall von GPI-YFP war die Bildung von Clustern schwächer als im Vergleich zu den anderen Markern ausgebildet (s. Abbildung 4-22).

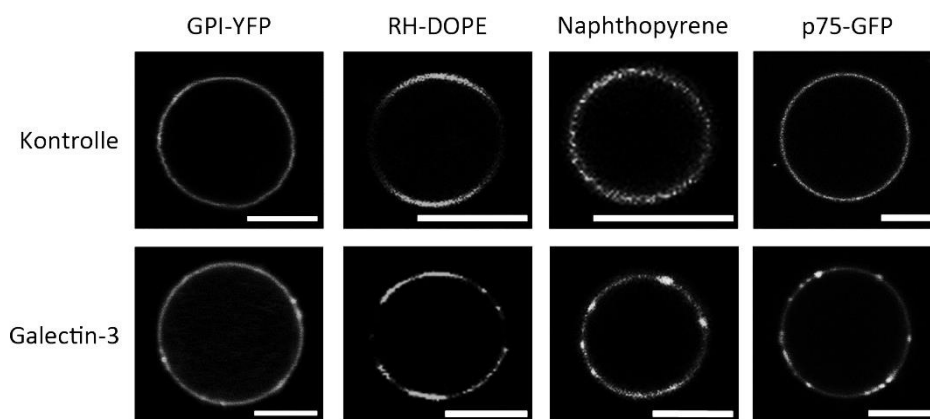


Abbildung 4-22 Verteilung von Lipiden und Proteinen in einer nativen Membran

GPMVs wurden aus MDCK II Zellen isoliert und mit 1 μM Galectin-3 inkubiert (untere Reihe). Im Fall von GPI-YFP und p75-GFP exprimierten die Zellen stabil das Protein, wohingegen die Lipide nach Isolation zu den Vesikeln hinzugegeben wurden. Die Aufnahmen erfolgten mit einem KLS-Mikroskop in der Äquatorialebene des Vesikels. Maßstab 5 μm

4.3.3.2 Verteilung von p75-GFP in GPMVs nach Inkubation mit Galectin-3-WT

Um das Clusterpotenzial von Galectin-3 näher zu charakterisieren, wurde in den folgenden Versuchen der Marker p75-GFP verwendet. P75 ist ein Neurotrophinrezeptor, von dem gezeigt wurde, dass er mit Galectin-3 interagiert (Delacour *et al.*, 2007). Es wurden daher Kolokalisationsstudien durchgeführt, um eine eventuelle Interaktion auch in diesem Modell bestätigen zu können. Abbildung 4-23 zeigt GPMVs aus einer MDCK II Zelllinie, in die stabil das

Fusionsprotein p75-GFP transfiziert wurde. Nach Isolation konnte eine Kolokalisation von Alexa647-markiertem Galectin-3 und p75-GFP detektiert werden. Gemessen wurde dies mit dem Pearson-Koeffizient, der einen Wert bis zu 0,72 erreichte. Ebenfalls wurde die Größe der Cluster in der Membran mit der Software Leica LAS AF gemessen; diese lag durchschnittlich bei 684 nm.

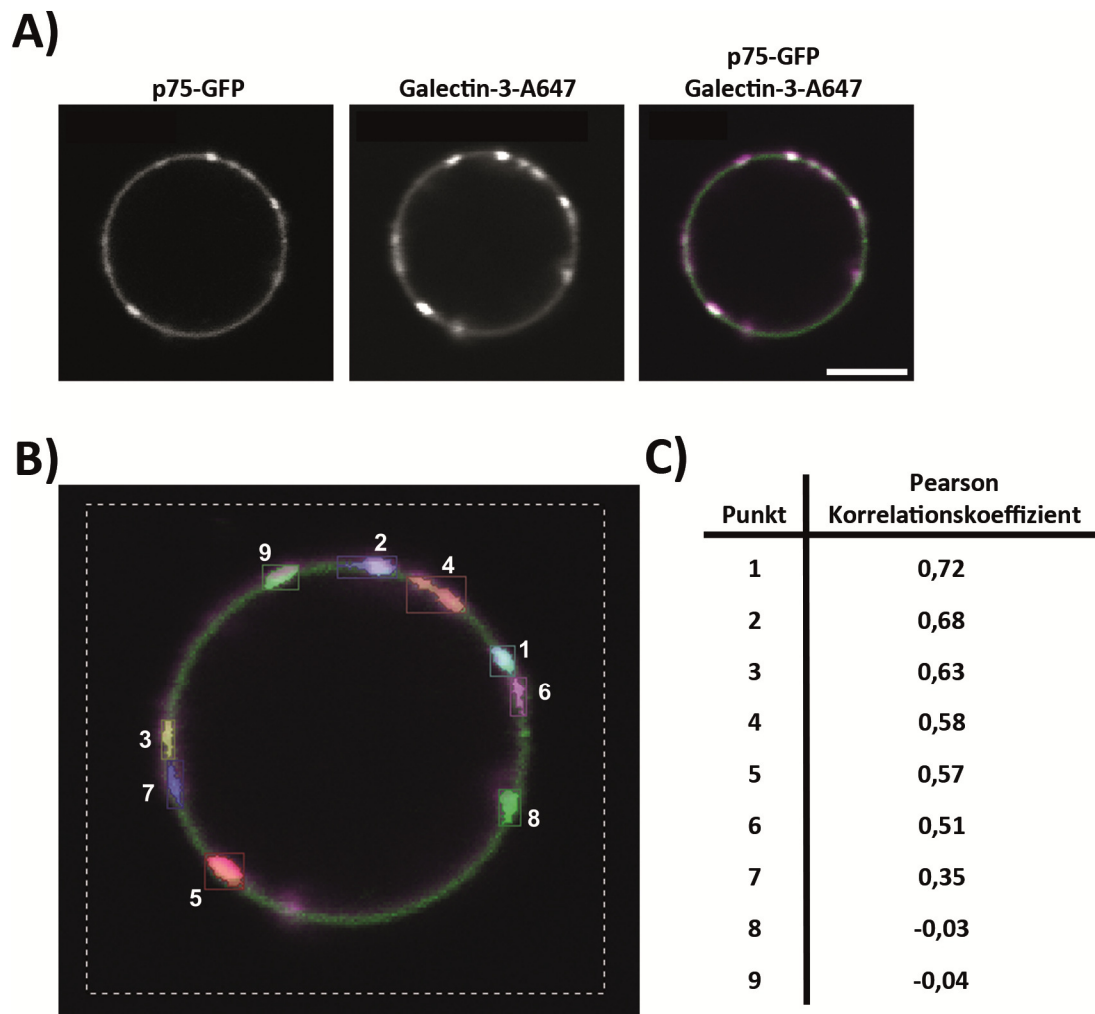


Abbildung 4-23 Kolokalisation von p75-GFP mit Galectin-3-A647 in GPMVs

Dargestellt ist ein GPMV aus MDCK II Zellen, die stabil p75-GFP exprimierten, und welches mittels der NEM-Isolationsmethode gewonnen wurde. Das Vesikel wurde mit 1 μ M Galectin-3-A647 30 min vor Aufnahme des Bildes inkubiert **(A)**. In **B)** ist die Kolokalisation an den dargestellten Punkten (1-9) mittels des Pearson Korrelationskoeffizient vermessen wurden. **C)** zeigt die Auflistung der einzelnen Werte des Koeffizienten. Die Auswertung erfolgte mit der Software Volocity in der Version 5.3. Maßstab 5 μ m

Im Folgenden galt es das Clustern durch Verwendung von Mutanten, Inhibition der Bindung und Veränderung des pHs näher zu analysieren. Verwendet wurden zwei Mutanten (Galectin-3-ΔN und Galectin-3-R186S). Galectin-3-ΔN besitzt eine verminderte Fähigkeit zu oligomerisieren und Galectin-3-R186S bindet schwächer an Lactosylsaccharide. Ebenfalls wurde gleichzeitig mit Lactose und Galectin-3-WT inkubiert, um eine direkte Zuckerabhängigkeit zu testen. In einem weiteren Versuch wurde der pH auf 5 gesenkt, da bei diesem pH sowohl die Bindung als auch die Fähigkeit zu Oligomerisieren von Galectin-3 geschwächt ist.

Galectin-3 clustert p75-GFP in der Modellmembran der GPMVs. Dies war nicht der Fall, wenn gleichzeitig mit Lactose inkubiert wurde. Durch Inkubation mit Galectin-3-ΔN war das Clustern vermindert zu sehen bzw. nicht signifikant von der Kontrollpopulation zu unterscheiden. Die Mutante Galectin-3-R186S konnte ebenfalls das Clustern von p75-GFP nicht induzieren. Mit dem Hintergrund, dass die Oligomerisierung mit ASF stark eingeschränkt ist, wenn der pH auf unter 6 gesenkt wurde, konnte durch eine Ansäuerung des äußeren Milieus das Clustern ebenfalls verhindert werden (s. Abbildung 4-24).

Um den Effekt der Umverteilung von p75-GFP in der Membran von GPMVs durch Galectin-3-WT zu quantifizieren, wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ in der Version 1.46r gearbeitet, das kreisrunde Intensitätsprofile von der Fluoreszenz (in Graustufen von 0 - 255) der Vesikel erstellen konnte (s. 3.11.1). Gemessen wurde insgesamt an 360 Punkten im Kreis, woraus sich ein Profil ergab, das die Schwankungen der einzelnen Fluoreszenzintensitäten im Vesikel wiedergab. Aus Berechnung des Quotienten der Standardabweichungen und der Mittelwerte konnte abgeschätzt werden, wie stark die Fluoreszenz und damit das Protein im Vesikel akkumuliert vorlag. Als Kontrolle wurden unbehandelte Proben mitgeführt, bei denen sich eine Streuung von bis zu 18 % um den Mittelwert ergab. Wurde zusätzlich die Probe mit Galectin-3 inkubiert, stieg die Streuung signifikant auf über 44 % an. Durch Behandlung mit den Mutanten, der Azidifizierung oder mit Lactose sank die Streuung wieder auf 20 % (s. Abbildung 4-24).

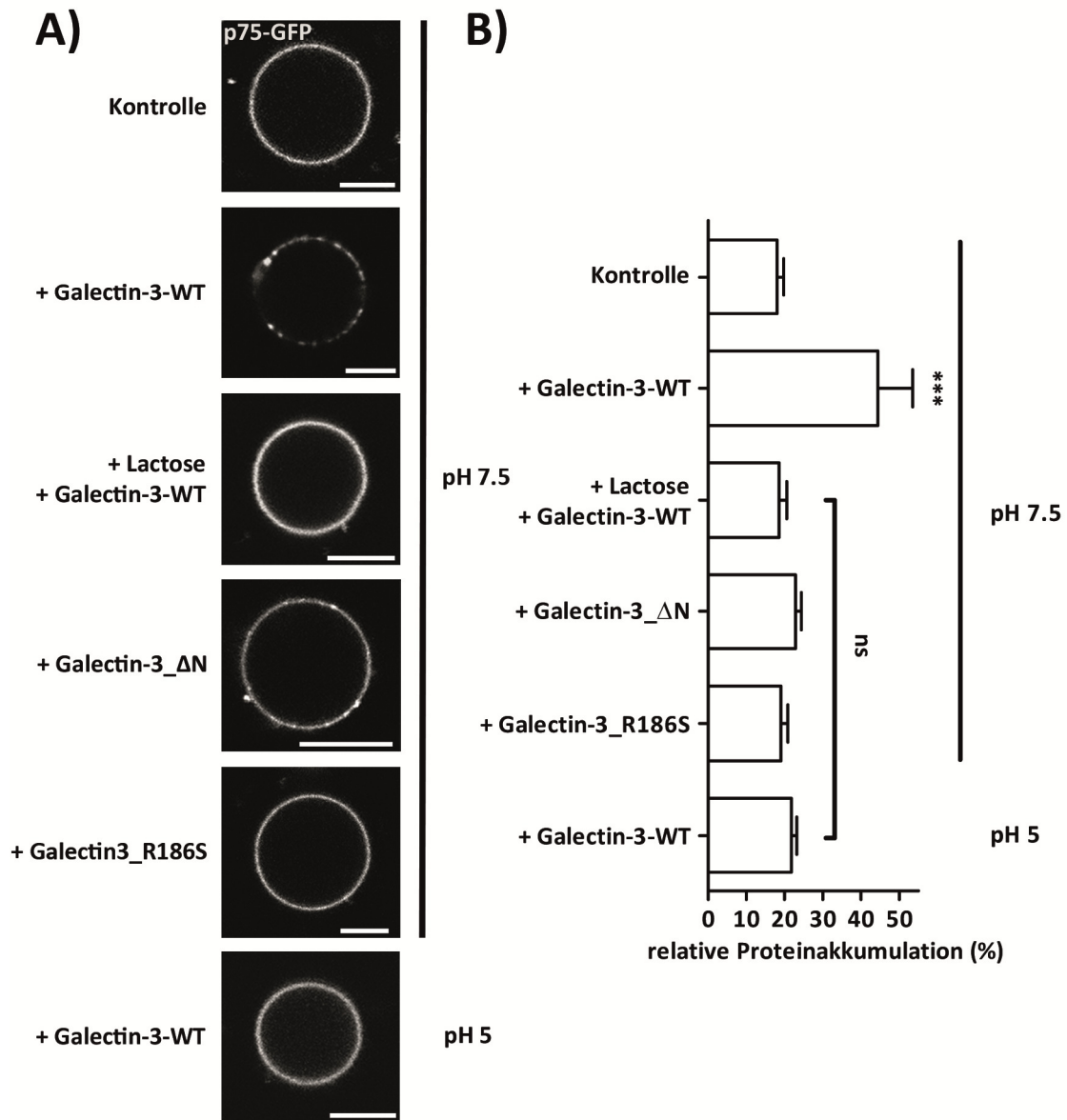


Abbildung 4-24 Einfluss von Galectin-3 auf die Verteilung von p75-GFP in GPMVs

Dargestellt sind GPMVs aus MDCK II Zellen, die stabil p75-GFP exprimierten und welche mittels der NEM-Isolationsmethode gewonnen wurden. Die Vesikel wurden jeweils mit 1 μ M Galectin-3-WT mit oder ohne 10 mM Lactose oder den Mutanten Galectin-3_ΔN und Galectin-3_R186S (jeweils 1 μ M) 30 min vor Aufnahme des Bildes inkubiert. Im untersten Bild wurde das Vesikel bei pH 5 mit 1 μ M Galectin-3-WT versetzt (**A**). Durch Messung von kreisförmigen Fluoreszenzintensitäten um das Vesikel (s. 3.11.1) konnte die Verteilung von p75-GFP in der Membran näher spezifiziert werden. **B**) Dargestellt ist die prozentuale Schwankung der Standardabweichung um die gemittelte Fluoreszenzintensität. Die statistische Analyse erfolgte anhand einer einfaktoriellen ANOVA gefolgt von einem Bonferroni-Post-Test (***) ($p < 0,001$).

4.3.3.3 3D-Visualisierung der Clustereigenschaften von Galectin-3 in GPMVs

Da die Form des Clusters in zweidimensionaler Ansicht aufgenommen wurde, konnten entweder punktförmige Fluoreszenzanreicherungen von p75-GFP oder Areale, die weniger p75-GFP beinhalten, beobachtet werden. Um das Ausmaß der Größe dieser Areale genauer definieren zu können, wurden in Z-Ebene mit Unterstützung von Leica Microsystems (Mannheim) Bilder aufgenommen. Es zeigte sich, dass die Areale, in denen p75-GFP angereichert vorlag, mehrere Mikrometer groß waren (s. Abbildung 4-25).

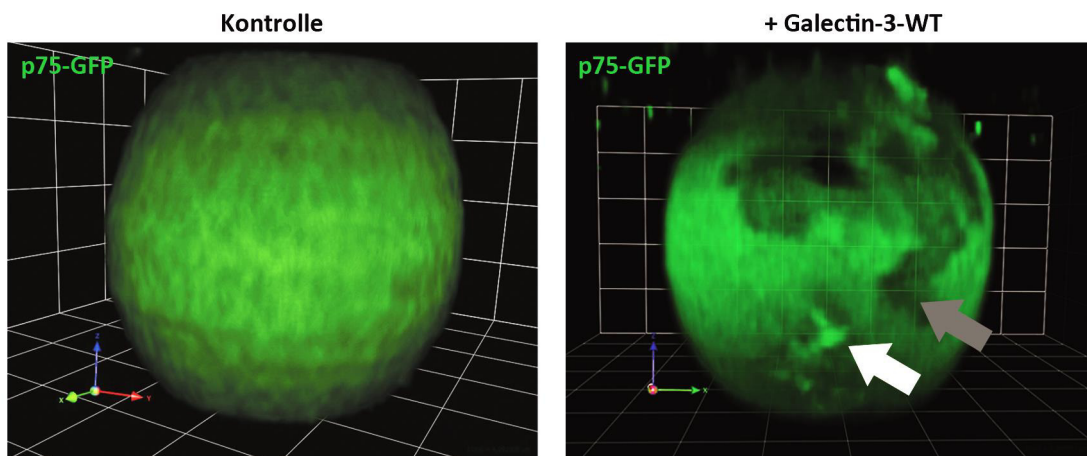


Abbildung 4-25 3D-Visualisierung der Akkumulation von p75-GFP nach Galectin-3-Inkubation

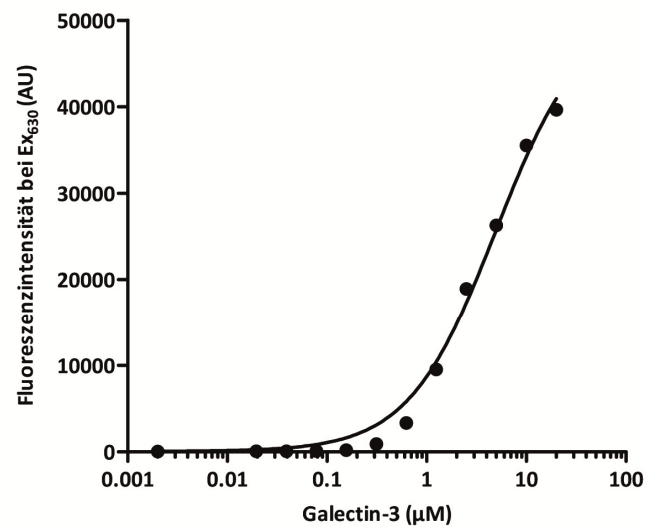
Dargestellt sind GPMVs aus MDCK II Zellen, die stabil p75-GFP exprimierten und welche mittels der NEM-Isolationsmethode gewonnen wurden. Die Bilder wurden in Z-Richtung mit einem KLS-Mikroskop aufgenommen. Im Fall der Kontrolle wurden 82 Bilder und bei Galectin-3-WT 75 Bilder mit einem Abstand von jeweils 0,16 μm aufgenommen. Zusammengesetzt wurden die einzelnen Bilder mit der Software Volocity in der Version 5.3. Der weiße Pfeil illustriert eine Anreicherung von p75-GFP, wohingegen der graue Pfeil eine Senkung der Fluoreszenz von p75-GFP in der Membran aufzeigt. Die Seitenlänge eines weißen Quadrats im Hintergrund beträgt 1 μm .

4.3.4 pH-abhängige Bindung von Galectin-3 an native Membranen

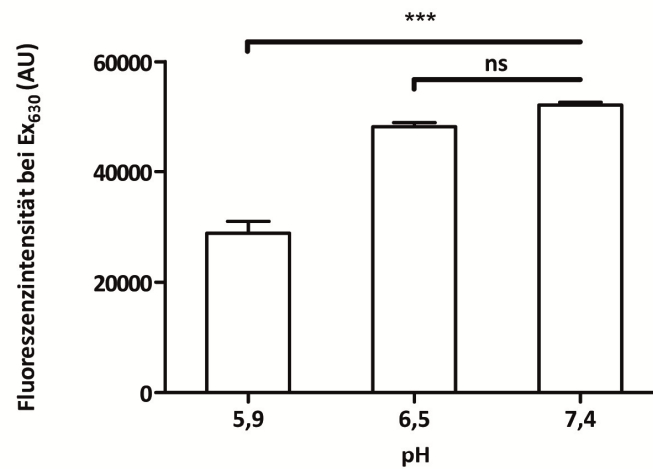
Galectin-3 zeigte eine pH-abhängige Bindung an Liganden, die frei in Lösung zugänglich waren. Im nächsten Schritt sollte die Komplexität der Zellmembran miteinbezogen werden, um die Bindungseigenschaften mit komplexen Glykoproteinen und -lipiden zu analysieren. Es wurden konfluent-gewachsene MDCK II Zellen verwendet und diese mit Alexa647-markiertem Galectin-3 inkubiert. Die Inkubation und Messungen der Fluoreszenzintensität erfolgten bei 4 °C, um Endozytosevorgänge zu inhibieren und damit die reine Bindung von Galectin-3 beobachten zu können. Hierbei ergab sich eine Dissoziationskonstante (K_d) bei pH 7,4 von 4,9.

Des Weiteren wurde die Bindung mit drei unterschiedlichen pH-Werten gemessen, um die Bindungseigenschaften zwischen Zelloberfläche und endosomalen Organellen nachahmen zu können. Dazu wurden die pH-Stufen 5,9, 6,5 und 7,4 gewählt. Es zeigte sich, dass die Bindung zwischen pH 6,5 und 7,4 keine signifikanten Änderungen aufwies, allerdings wurde die Bindung an MDCK II Zellen um knapp 45 % geschwächt, wenn das Protein bei pH 5,9 inkubiert wurde.

A)



B)



C)

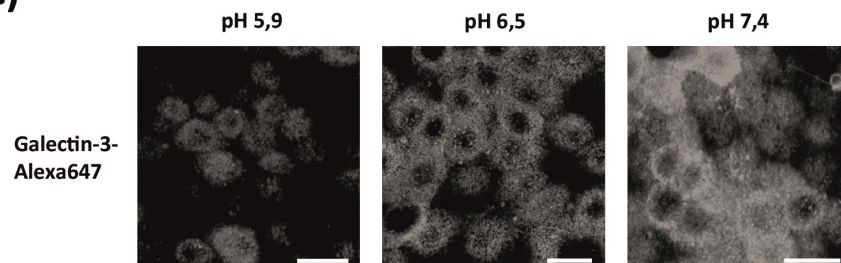


Abbildung 4-26 pH-abhängige Bindung von Galectin-3-A647 an die Oberfläche von MDCK II Zellen (Legende s. nächste Seite)

Galectin-3-A647 wurde mit MDCK II Zellen (5 Tage lang kultiviert) inkubiert und nach intensivem Waschen die Fluoreszenz bei einer Excitation von 630 nm und einer Emmission von 670 nm in einem Plattenlesegerät bei 4°C vermessen (**A** und **B**) oder Bilder in einem KLSM bei gleicher Laserleistung (40 %) und PMT-Einstellungen (502 V) aufgenommen (**C**). In **A**) erfolgte die Inkubation mit einer aufsteigenden Reihe des Proteins, wohingegen in **B**) und **C**) jeweils 1,5 µM Galectin-3-A647 verwendet wurden. Die Inkubation erfolgte in **B**) und **C**) in Anwesenheit von pH 5,9, 6,5 oder 7,4, welche den physiologischen pH-Wert zwischen der Oberfläche der Membran und unterschiedlichen Endosomen widerspiegeln sollten. Die Nicht-lineare Regression bzw. die ANOVA mit folgendem Bonferroni-Post-Test (n=3) (**A** bzw. **B**, entsprechend) wurden mit GraphPad Prism durchgeführt.

4.3.5 Selektive pH-abhängige Affinitäten von Galectin-3

Galectin-3 bindet freie Glykane und welche, die mit Proteinen verknüpft sind. Untersuchungen zu Glykolipiden hingegen sind nur wenige durchgeführt wurden (s. 2.3.2). Daher wurde, um eine weitere Rolle von Glykolipiden in der Zelle zu studieren, Galectin-3 mit Lipid-beschichteten Nitrozellulosemembranen inkubiert, die unterschiedliche Glykolipide und deren Lipidgrundstruktur (Ceramid und Sphingomyelin) enthielten. Diese Membranen wurden ähnlich der Western Blot-Methode verwendet, allerdings wurde fettfreies BSA zum Blockieren benutzt, da Albumin bis zu 6 Fettsäuren sequestrieren kann. Nach Inkubation mit 1 µg/mL (0,4 µM) Galectin-3 mit der Membran über Nacht konnte bei neutralem pH keine Bindung an ein Lipid nachgewiesen werden. Wurde der pH auf 6 erniedrigt, konnte ein Signal auf Höhe von Sulfatiden detektiert werden. Dies spricht für eine selektive pH-abhängige Bindung von Galectin-3 an Lipide (s. Abbildung 4-27).

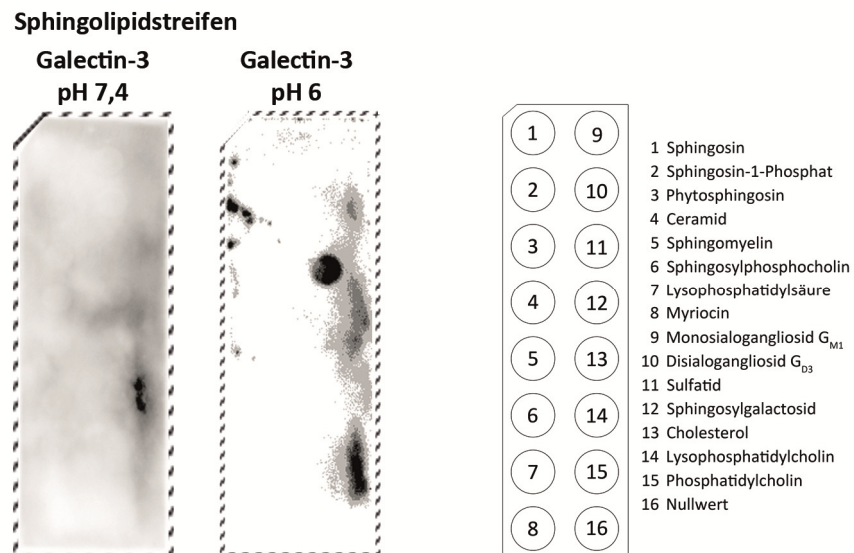


Abbildung 4-27 Bindung von Galectin-3 an Lipiden

0,4 μ M Galectin-3 wurde mit einem Sphingolipidstreifen inkubiert, auf den 15 unterschiedliche Lipide beschichtet waren. Die Inkubationsschritte erfolgten mit fettfreiem BSA und Galectin-3 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (169) nachgewiesen. Die Entwicklung erfolgte für 10 sec in Luminol (Dura, 1:1 mit TBS-T verdünnt).

Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde mit der Arbeitsgruppe von Kai Simons (*The Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics*, Dresden) kooperiert. Hierbei wurde eine Sulfatidinteraktion mit Hilfe der LMA-Methode (s. 3.3.1.2) versucht nachzuweisen. In Zusammenarbeit mit Thomasz Buhl konnte eine pH-abhängige Bindung von Galectin-3 mit 0,05 mol % Sulfatiden ebenfalls bestätigt werden (s. 7.6).

4.3.5.1 Einfluss der Bindungsintensität von Galectin-3 durch Sulfatide an nativen

Membranen von GPMVs

Da sowohl mit einem Sphingolipidstreifen (s. Abbildung 4-27) als auch mit der LMA-Methode eine Interaktion von Galectin-3 mit Sulfatiden nachgewiesen werden konnte, sollte die Bindungskapazität des Proteins zu einer nativen Membran durch Sulfatide im nächsten Schritt untersucht werden. Hierfür wurden GPMVs (isoliert aus MDCK II Zellen) vor der Inkubation mit Alexa647-markiertem Galectin-3 mit einem Sulfatid-Antikörper behandelt, der alle Sulfatide in der Membran maskieren sollte, so dass die Bindung blockiert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels eines Durchflusszytometers und wurde zum einen bei pH 7,5 und zum anderen bei pH 6 durchgeführt. Die Blockierung von Sulfatidbindungsstellen wirkte sich bei pH 7,5 nicht negativ auf die Bindung von Galectin-3 zu nativen Membranen aus, wohingegen bei pH 6 die Intensität signifikant um 15 % sank (s. Abbildung 4-28).

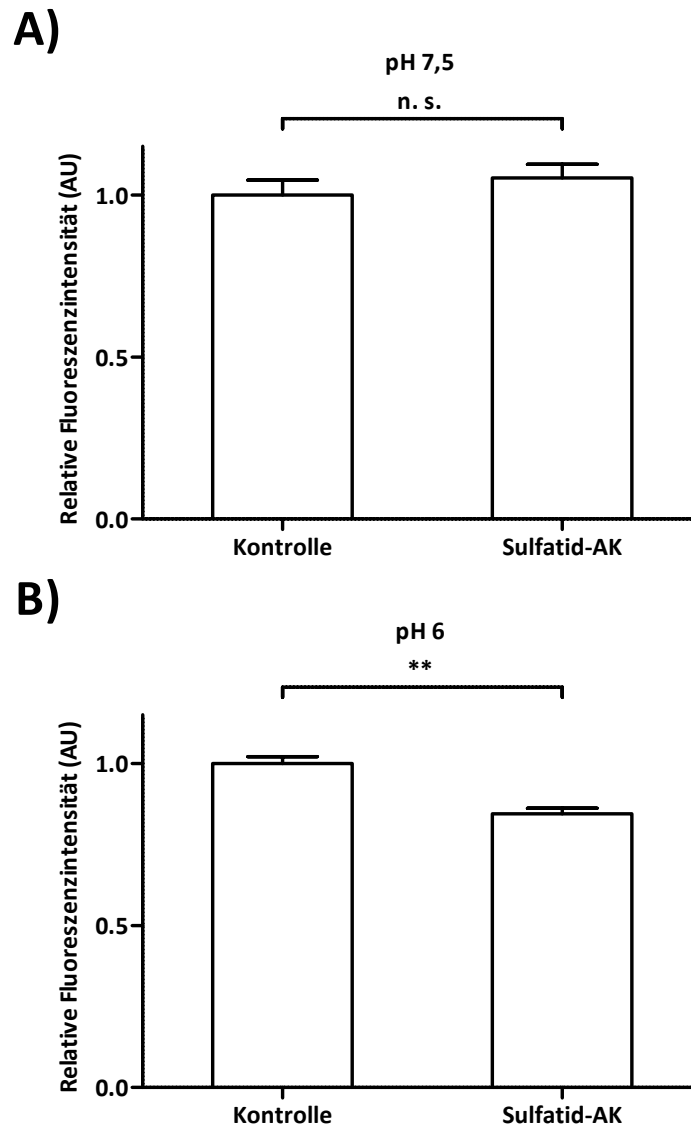


Abbildung 4-28 pH-abhängige Bindung von Galectin-3-A647 an GPMVs nach Behandlung mit einem Sulfatid-Antikörper

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von Galectin-3-A647 gebunden an GPMVs, die mittels eines Durchflusszytometer gemessen wurden. Die Inkubation des Proteins erfolgte bei pH 7,5 (**A**) bzw. 6 (**B**) und wurde mit und ohne vorherige Zugabe eines Sulfatid-bindenden Antikörpers (Sulfatid-AK 1:125, 45 min bei 4 °C) durchgeführt. Ausgewertet wurden 6.000 - 49.000 Ereignisse, die sich auf Alexa647-positive Messbereiche bezogen. Die statistische Analyse erfolgte anhand eines gepaarten t-Test (* $p < 0,05$, $n = 3$).

5. Diskussion

5.1 GPMVs als natives Modellmembransystem

Für diese Arbeit wurde das Modell der *giant plasma membrane vesicles* (GPMVs) charakterisiert, um nähere Einblicke in die Interaktionen zwischen Galectin-3 und der Zellmembran zu erhalten. Bekannt war, dass mit PFA isolierte GPMVs aus HeLa-Zellen bis zu 30 µm große Vesikel bilden und dass die Membran der GPMVs fähig ist, Phasen zu bilden (Baumgart *et al.*, 2007). Arbeiten von Levental *et al.* zeigten, dass durch die Isolation mit dem Reduktionsmittel NEM die Lipidkomposition der Vesikel mit der Zellmembran vergleichbarer ist (Levental *et al.*, 2011). Es wurden daher anfangs beide Methoden miteinander verglichen und entsprechend der Versuche die Wahl der Methode angepasst. Generell war zu beobachten, dass PFA-isolierte GPMVs stabiler waren und damit für methodische Prozeduren besser geeignet waren, die bspw. mehrere Waschschriffe benötigten. Ebenfalls konnten PFA-isolierte Vesikel über mehrere Tage aufbewahrt werden. Jedoch beeinflusst PFA die Membran in der Weise, dass Proteine miteinander verknüpft werden und damit eventuell die Flexibilität auf äußere Einflüsse vermindert wird. Es wurden daher für Versuche, die das Galectin-3-abhängige Verknüpfen von Proteinen in der Membran zeigen sollten, NEM-isolierte Vesikel verwendet.

Die Bestimmung der Lipidzusammensetzung wurde anhand der Folch-Extraktion durchgeführt und mittels einer *high performance* DC wurden spezifische Lipide nachgewiesen. Da nur wenige Lipide identifiziert werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass diese in der Membran angereichert vorzufinden waren. So konnte Cholesterol nachgewiesen werden, das während des sekretorischen Transportweges von dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran ankonzentriert wird, wodurch die Membran bis zu 40 % an Cholesterol beinhalten kann. Ebenfalls wurden Ganglioside gefunden, die grundlegend für Galectin-3-Interaktionsstudien waren, da das Protein Saccharide bindet. Des Weiteren wurden Lipide des endoplasmatischen Retikulums in den GPMVs gefunden (Aussage von Michal Grzybek, MPI Dresden). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wären weitere Analysen interessant, die die Lipidspezies genauer definieren würden, um bessere Aussagen über die Zusammensetzung machen zu können. Dies kann mit der *shot-gun lipidomics*-Methode umgesetzt werden (Schwudke *et al.*, 2006), wobei sowohl qualitativ (Acylreste, Glykosylierung) als auch quantitativ der Lipidgehalt bestimmt werden kann.

Bei der Proteinzusammensetzung der Vesikel konnte festgestellt werden, dass ein weitreichendes Bandenspektrum von Proteinen detektiert werden konnte, das ähnlich des MDCK II Volllysats war, allerdings wurden bei genauerer Betrachtung mittels Western Blot einige Unterschiede festgestellt. Untersucht wurden Proteine des Zytoskeletts (Tubulin, Aktin), Endosomenmarker (Rab11), Polaritätsmarker (E-Cadherin, GP114) und die zytosolisch vorkommende GAPDH. Es konnte davon ausgegangen werden, dass das Zytoskelett nicht im polymerisierten Zustand war, da sonst die Vesikelabknospung von der Zelle nicht möglich gewesen wäre. Daher beruht der erhöhte Gehalt an Tubulin in den Vesikeln wahrscheinlich auf freien Tubulinmono- oder dimeren. Da kein GTP bzw. ATP zu den Vesikeln gegeben wurde, kann davon ausgegangen werden, dass keine polymerisierten Stränge des Zytoskeletts im Vesikel nachträglich ausgebildet werden konnten. Dies wurde in HeLa-Zellen durch Arbeiten von Keller *et al.* gezeigt, die den näheren Mechanismus der Abknospung des Vesikels untersuchten (Keller *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte kein Rab11 in den Vesikeln identifiziert werden, welches direkt unterhalb der Membran sitzt und als Marker für das apikale Recycling-Endosom gilt. Weiterhin konnte kein E-Cadherin, das als basolateraler Marker dient, in den Vesikeln detektiert werden, wohingegen der apikale endogene Marker GP114 angereichert im Vergleich zum Zelllysats in den Vesikeln vorkam (s. Abbildung 4-14). Diese Anreicherung konnte abhängig der Isolationsdauer verbessert werden. Dies zeigten Analysen von Wymke Ockenga (Diplomarbeit 2011, s. 7.6), welche zusammen mit dem erhöhten Anteil an Cholesterol darauf schließen lässt, dass die Vesikel zu hohen Anteilen aus apikalen Membranfragmenten bestanden.

Für die Mikroskopie waren GPMVs gut geeignet, da sie wegen ihrer Größe von bis zu 30 µm bereits im Lichtmikroskop mit einer 20fachen Vergrößerung zu identifizieren waren (s. Abbildung 4-13). Des Weiteren konnten sie für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden, indem man durch Transfektion von GFP-Proteinen oder durch nachträgliche Zugabe von Lipidfluorophoren ein breites Spektrum an Anregungswellenlängen anwenden konnte. Die Intensität der Fluoreszenz konnte hierbei durch Anpassung der Lipidkonzentration flexibel auf die Anforderungen des Mikroskops angepasst werden. Ebenfalls waren sie für die hochauflösende Mikroskopie geeignet, obwohl sich die Vesikel sensitiv gegenüber dem GSDIM-Puffer zeigten, wodurch die Anzahl an mikroskopierbaren Vesikeln verringert war. Ungeeignet war die GSDIM-Technologie bei der Bildaufnahme von Proteinclustern, da Signale, die nahe beieinander lagen, herausgerechnet wurden, um falsch-positive Ereignisse zu verringern. Der Schwellenwert dafür war fix und konnte nicht manuell angepasst werden (Aussagen von Christian May, Leica Microsystems).

Da die Vesikel aus einer doppelschichtigen Membran bestanden und diese zwischen 5 - 20 nm dick war, konnten sie für die Bestimmung der Auflösungsgrenze von Mikroskopen verwendet werden. Die theoretischen 200 bis 250 nm nach dem Gesetz von Abbe konnten sowohl mit dem Epifluoreszenz- als auch mit dem KLS-Mikroskop nicht erreicht werden. Die Grenzen lagen bei beiden Mikroskopen im Bereich zwischen 350 und 400 nm. Hingegen konnte mit der GSDIM-Technik eine Grenze im Bereich zwischen 50 und 60 nm erreicht werden.

Des Weiteren wurde die Verwendung von GPMVs für die Durchflusszytometrie etabliert. Hier konnten reproduzierbarere Ergebnisse mit PFA-isolierten Vesikeln erreicht werden, da diese sich stabiler gegenüber den NEM-isolierten Vesikeln zeigten. Jedoch ist zu beachten, dass durch PFA falsch-positive Interaktionen zwischen dem untersuchenden Protein und der Membran entstehen könnten. Dies kann in Abbildung 4-20 nicht ausgeschlossen werden, da Reste von PFA die Bindung von Galectin-3 an die Membran beeinflussen könnten. Ein falsch-positives Signal des Protein-markierenden Fluorophors Alexa647 konnte ausgeschlossen werden, da freies Alexa647 kein Signal bzw. keinen Unterschied zur Negativkontrolle ergab.

Weiterhin konnten Phasenseparationen mit unterschiedlichen Lipiden bzw. Proteinen detektiert werden (s. Abbildung 4-17). Hierbei war allerdings zu beobachten, dass nicht alle Vesikel Phasenseparationen zeigten und dass auch die Größe der Phasen variierte. Es konnten über mehrere μm Phasen ausgebildet werden, wie dies auch für HeLa Zellen gezeigt wurde (Baumgart *et al.*, 2007). Diese waren Temperatur-sensitiv, da sie bei vorgekühlten Proben verhäuft detektiert wurden. Zur Identifizierung von Phasen wurde der *liquid disordered*-Marker Rhodamin-Diolelphosphatidylethanolamin (RH-DOPE) verwendet, der sich in entgegengesetzten Bereichen zu dem *liquid ordered*-Marker Naphthopyren aufhielt. Ebenfalls wurde der GPI-Anker aus RH-DOPE-positiven Phasen ausgeschlossen. Dies bestätigt die Aussagen von Brown *et al.*, die GPI-verankerte Proteine mit *lipid-raft* abhängigen Strukturen assoziiert vorfanden und ist ein Hinweis für *raft*-positive Strukturen in den GPMVs (Brown *et al.*, 1992). Das Protein p75 allerdings wurde in ähnlichen Bereichen wie RH-DOPE gefunden. Dies zeigten auch Studien von Delacour, bei denen p75 in *lipid raft*-unabhängigen Membranstrukturen den sekretorischen Transportweg durchläuft (Delacour *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass Phasenseparationen möglich sind, um weitere Analysen durchführen zu können, bei denen bspw. exogen zugegebene Proteine anhand ihrer Phasenassoziation eingeordnet werden können. In einigen Fällen allerdings wurden jedoch falsch-positive Phasen gebildet, da aus optischen Gründen die Fluorophore RH-DOPE und OregonGreenPE ein stärkeres Signal am oberen bzw. unteren Rand des Vesikel im Mikroskop ergaben, als dies an

den jeweiligen Seiten der Fall war. Wurde ein solches Verhalten detektiert, wurde es aus den mikroskopischen Analysen ausgeschlossen.

5.2 Lipidbindende Eigenschaften von Galectin-3

Galectin-3 bindet Zucker-abhängig an unterschiedliche Glykoliganden. Glykane sind in der Zelle in freier oder in gebundener Form an Proteinen und Lipiden vorhanden. Der Großteil der Untersuchungen, die Zucker-abhängige Interaktionen von Galectin-3 in der Literatur zeigten, fand entweder mit freien Glykanen oder aber mit glykosylierten Proteinen statt. Inwiefern die Bindung von Galectin-3 an glykosylierte Lipide stattfindet bzw. ob Lipide die Funktion von Galectin-3 in der Zelle beeinflussen, ist wenig charakterisiert.

Dass Lipide einen Einfluss auf die Interaktion von Galectin-3 mit der Zellmembran haben, konnte in Abbildung 4-20 gezeigt werden, wonach eine Proteindepletion die Interaktion zur Zellmembran schwächte, allerdings nicht vollständig inhibierte. Ebenfalls konnte die Depletion von Cholesterol die Bindung senken, was auf einen direkten bzw. indirekten Einfluss von Cholesterol schließen lässt. Cholesterol als Lipidbestandteil jeder Zellmembran kann die Rigidität und die Höhe der Lipidschicht beeinflussen und führt dazu, dass sich gewisse Lipide bedingt durch die Länge des Acylrestes oder der hydrophilen Kopfgruppe in der Nähe von Cholesterol ansammeln (s. 2.4). Dies wiederum kann die Bindung von Proteinen an Lipidliganden erhöhen, da sie sich konzentriert an einer Stelle der Membran aufhalten.

Zur Identifizierung eines spezifischen Lipids, das mit Galectin-3 interagieren könnte, wurde versucht, die Ergebnisse von Lukyanov *et al.* zu reproduzieren (Lukyanov *et al.*, 2005). In diesen Studien wurden direkte Interaktionen mit einzelnen Lipiden nachgewiesen und postuliert, dass Galectin-3 eine Membran überqueren kann. Diese Daten konnten nicht mit denen in dieser Arbeit verwendeten Methoden bestätigt werden, da sowohl die Interaktion mit Phospholipiden als auch die Überquerung der Membran nicht das veröffentlichte Ergebnis widerspiegeln. Durchgeführt wurden die Experimente einerseits mit LUVs, die eine entsprechende Lipidkomposition besaßen und andererseits mit GPMVs, die die Komplexität der Zellmembran nachahmen konnten (Daten nicht gezeigt). Es wurde daraufhin der Fokus erweitert und mehrere Glykolipide untersucht, mit denen zunächst keine Bindung an Galectin-3 nachgewiesen werden konnte. Durch Erkenntnisse, die mit freien Sacchariden gewonnen wurden, bei denen eine pH-Wert-Änderung die Bindung schwächte oder sogar die Spezifität änderte (s. 7.6), wurden die gleichen Untersuchungen bei einem sauren pH von 6 durchgeführt. Mit dieser Ansäuerung konnte die Interaktion zu Sulfatiden detektiert werden.

Dies wurde anhand eines Sphingolipidstreifens, der unterschiedliche Lipide auf einer Nitrozellulosemembran gespottet hatte und anhand der LMA-Methode (s. 7.6) nachgewiesen. Galectin-3 zeigt damit einen pH-abhängigen Spezifitätenwechsel. Diese Interaktion mit anderen Galectinen wurde schon bewiesen: sowohl Galectin-4 als auch -8 können mit solchen Lipiden eine Bindung eingehen (Delacour *et al.*, 2005, Ideo *et al.*, 2003). Parallel zu diesen Daten wurde eine Kristallstruktur von Galectin-8 und einer sulfatierten Lactose veröffentlicht, die genaue Einblicke ergab, welche Aminosäuren mit dem Liganden wechselwirken. Sterisch nahe liegen hierbei die Aminosäuren Arginin45, Glutamin47, Arginin59 und Tryptophan86. Diese Aminosäuren sind ebenfalls in der Bindungstasche von Galectin-3 zu finden und wurden als entscheidende Komponenten für die Zuckerbindung beschrieben (C-Stelle, Leffler *et al.*, 2004).

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass eine pH-abhängige Sulfatidbindung neben den zwei beschriebenen Methoden mit zwei anderen Methoden untersucht wurde. Hierfür wurden zum einen LUVs und zum anderen GUVs verwendet, welche 0,05 bis 10 mol% Sulfatide enthielten. Mit beiden Methoden konnte keine Bindung an die Membran bei pH 6 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es scheint, dass noch andere Faktoren wichtig sind, damit Galectin-3 an Sulfatide binden kann. Daher wäre es interessant, den Einfluss der Membranspannung oder der Rigidität zu untersuchen, da dies die Interaktion zu Liganden beeinflussen kann. Als Beispiel wäre hier die Erkennung von Mausspermien an der Oozyte zu nennen, die über Glykosphingolipide fungiert und durch eine Cholesteroldepletion verstärkt wird (Lingwood *et al.*, 2011) und die verstärkte Bindung von BAR Proteinen an gewölbten im Vergleich zu ungewölbten Membranen (Ambroggio *et al.*, 2013).

Dass die Sulfatidbindung einen Einfluss in der Zelle hat, wurde mit den Experimenten aus Abbildung 4-28 illustriert, wonach die Bindung von Galectin-3 an Sulfatide durch Vorbehandlung der Zellmembran mit Sulfatid-Antikörpern geschwächt wurde. Dieser Effekt war bei neutralem pH nicht zu erkennen. Die Sulfatid-bedingte Senkung der Bindung lag bei ca. 15 % im Vergleich zu der Kontrollpopulation. Dies könnte auf eine pH-abhängige Spezifität in der Zelle hinweisen, wobei die Endozytose von Galectin-3 noch Sulfatid-unabhängig verläuft, allerdings der Einfluss des Lipids nach einer allmählichen Ansäuerung in Endosomen durch ATPasen zunimmt. Ähnlich der Freisetzung von Transferrin in azideren endosomalen Kompartimenten, verliert Galectin-3 die Bindung zu komplexen Liganden (s. Abbildung 4-8), was durch eine erhöhte Affinität zu Sulfatiden unterstützt werden könnte.

5.3 Oligomerisierung

Zur Oligomerisierung von Galectin-3 gibt es bereits einige Studien, die die komplexe Verlinkung des Proteins mit einem Liganden beschreiben. Es wird angenommen, dass Galectin-3 über seine N-terminale Domäne ein Pentamer mit seinem Liganden eingehen kann (Ahmad *et al.*, 2004a). Weitere Studien deuten auf ein anderes Modell hin, bei dem Galectin-3 über seine C-terminale Domäne oligomerisieren könnte, wobei auch beide Modelle kombiniert ablaufen könnten (Lepur *et al.*, 2012). Diese Studien wurden mit dem Ligand Asialofetuin (ASF) durchgeführt, welcher an bis zu acht Stellen glykosyliert werden kann und ein weites Spektrum an unterschiedlichen Zuckerketten aufweist (s. Abbildung 4-3). ASF wurde daher in dieser Arbeit als Grundlage verwendet, um Galectin-3 als Oligomer näher zu untersuchen, wobei die zwei Modelle der C-Typ- bzw. der N-Typ-Oligomerisierung eingehend charakterisiert wurden. Es wurde festgestellt, dass bei gleichbleibender ASF- und ansteigender Galectin-3-Konzentration die Stärke der Oligomerisierung konstant zunahm, wohingegen bei reziproker Prozedur es eine bestimmte ASF-Konzentration gab, bei der die gemessene Oligomerisierung nach Erreichen eines Maximum wieder abnahm (Abbildung 4-4). Diese Ergebnisse sprechen gegen das Modell des Pentamers, da bei gleichbleibender ASF-Konzentration ein Maximum erreicht werden müsste. In diesem Modell steht die Oligomerisierung in quantitativer Abhängigkeit zum Liganden. Des Weiteren kann eine zu hohe Konzentration des Liganden die Oligomerisierung inhibieren. Dies ist interessant, da im zellulären Kontext durch wechselnde Ligandenkonzentrationen eine Oligomerisierung an- bzw. ausgeschaltet werden könnte. Um dies zu spezifizieren, wurde der Versuch dahingehend wiederholt, dass nach Eintreten der Oligomerisierung der Ligand Lactose hinzugegeben wurde (s. Abbildung 4-5). Das Oligomer aus Galectin-3 und ASF konnte mit dieser Prozedur wieder aufgelöst werden, was dafür spricht, dass das Oligomer dynamisch in der Zelle in Abhängigkeit des Liganden entstehen kann.

Als Grundlage für eine C-Typ-Oligomerisierung müsste Galectin-3 zumindest zum Teil Liganden-unabhängig oligomerisieren. Um dies näher zu charakterisieren, wurde eine Mutante verwendet, die die N-terminale Domäne besaß, deren Fähigkeit zur Bindung an Lactose allerdings stark beeinträchtigt war. Durch Kombination von Wildtyp und Mutante zusammen mit ASF konnte keine Verstärkung der Oligomerisierung im Vergleich zu Experimenten ohne die Mutante detektiert werden (s. Abbildung 4-5). Dies wiederum würde gegen das Modell der C-Typ-Oligomerisierung sprechen. Lepur *et al.* konnten ebenfalls feststellen, dass das Oligomer eine Größe von ca. 1 μm annimmt. Vergleicht man dies mit der Größe eines Endosoms von 200-400 nm im Durchmesser, ist es schwer vorstellbar, dass dies auch in der Zelle zutrifft.

Daher wurde nach weiteren Liganden gesucht, um auszuschließen, dass die Oligomerisierung ASF-abhängig verläuft. Lactose bzw. LacNAc können keine Oligomerisierung mit Galectin-3 verursachen. Auch der komplexere Zucker A-Tetra, der für einige Messungen in dieser Arbeit verwendet wurde, zeigte ebenfalls keine messbaren ausgebildeten Oligomere. Allerdings führte der Zucker Lacto-N-neohexaose (LNnH) zur Bildung eines Oligomers. Eine Titration des Liganden zeigte, dass ähnlich des Alles-oder-Nichts-Prinzips eine gewisse Konzentration ausreichte, dass Galectin-3 ein 1 μ m großes Oligomer formte (s. Abbildung 4-6). Dies spricht dafür, dass die Größe des Oligomers unabhängig von dem Liganden ist. Des Weiteren spricht das Alles-oder-Nichts-Prinzip der Oligomerbildung für eine starke positive Kooperativität zwischen Ligand und Protein.

Um den Einfluss der Oligomerisierung auf die Affinität zu einem Liganden, bei dem Galectin-3 nicht oligomerisiert, zu untersuchen, wurde eine Methode verwendet, bei der die Bindung von Galectin-3 zu FucLac bestimmt wurde und gleichzeitig ASF bei konstanter Konzentration hinzupipettiert wurde (s. Abbildung 4-12). Des Weiteren wurde bei bekannter Dissoziationskonstante, A_{max} und A_0 von FucLac und des Inhibitors ASF eine Kurve kalkuliert, die die Situation einer mono- und multivalenten Bindung bei gemessener Konzentration nachahmen sollte. Diese Kurve konnte an die gemessenen Werte der Bindung ohne den Inhibitor angeglichen werden. Nach Zugabe des Inhibitors und Miteinberechnung einer mono- oder multivalenten Inhibitionskurve konnte nur bei geringer Galectin-3-Konzentration die Kurven an die gemessenen Daten angepasst werden. Stieg die Galectin-3-Konzentration über 3 μ M, wichen die gemessenen Daten von der theoretischen Inhibitionskurve ab. Dies spricht dafür, dass bei diesen Konzentrationen ein weiterer Parameter die Bindungskurve beeinflusst. Vergleicht man dieses Verhalten mit den Daten aus Abbildung 4-4, bei der die Oligomerisierung zwischen einer Konzentration von 2,3 und 4,7 μ M Galectin-3 nachweisbar ist, lässt dies den Schluss zu, dass der weitere Parameter Galectin-3 als Oligomer sein könnte. Wurde die gleiche Methodik wiederholt und statt ASF Lactose als Inhibitor hinzugegeben (s. 7.6), welche keine Oligomerisierung von Galectin-3 induzieren kann, konnte die Kinetik bei allen Bedingungen nachberechnet werden. Vergleicht man zusätzlich den Verlauf der Inhibitionskurve bei unterschiedlichem pH, zeigte sich, dass mit sinkendem pH die gemessenen Daten sich der theoretischen Kurve nach und nach anpassten. Unterhalb von pH 6 sank allerdings die Fähigkeit zu oligomerisieren um bis zu 75 % im Vergleich zu neutralem pH (s. Abbildung 4-10), was ebenfalls für die Oligomerbildung als weiteren Parameter sprechen würde. Damit wäre nachgewiesen, dass die Oligomerisierung direkt die Affinität von Galectin-3 beeinflusst.

Um den Einfluss der Oligomerisierung mit weiteren Liganden in der Membran zu untersuchen, wurden GPMVs verwendet, die als Markerprotein p75-GFP enthielten. Zuvor war bekannt, dass Galectin-3 Zell-Zell-Adhäsionen bewirken kann und durch Ausbildung einer Galectin-Glykoprotein-Schicht weitere zellphysiologische Prozesse beeinflusst (Nieminen *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde zuvor eine Interaktion von Galectin-3 mit p75-GFP nachgewiesen und der positive Einfluss auf die Sortierung von p75 zur apikalen Plasmamembran charakterisiert (Delacour *et al.*, 2007, Straube *et al.*, 2013). Es stellte sich hierbei die Frage, wie dieser Vorgang genauer abläuft und ob ein postuliertes Clustern des Proteins in der Membran stattfinden kann (Delacour *et al.*, 2006b). Die Untersuchungen mit GPMVs konnten ein Galectin-3-induziertes Clustern des Proteins bestätigen. Die Clusterausbildung entstand abhängig von der Zuckerbindung, der Oligomerisierung und dem pH-Wert der Lösung (s. Abbildung 4-24). Damit wäre dies ein Hinweis, dass Galectin-3 in der Membran p75-GFP clustern kann, um damit die ersten Schritte zur Trennung von anderen Proteinen einzuleiten. Im Folgenden wäre weiter interessant, inwiefern die Membran durch das Clustern verändert wird. Hierbei zeigen unveröffentlichte Daten, dass eine Galectin-3-induzierte Membrankrümmung auftreten kann (Aussage von Ludger Johannes, Institut Curie, Paris). Damit wäre auch der zweite Schritt der Sortierung, nämlich die Membranabtrennung mit spezifischen Liganden aus dem Endosom erklärbar, welches durch Galectin-3 verursacht werden könnte.

Ebenfalls konnte mit Hilfe der GPMVs die Membranadhäsion näher charakterisiert werden, wobei ab 0,3 μM Galectin-3 die Adhäsion begann und bei 1,25 μM über 80 % der Vesikel mit einander verbunden waren (s. Abbildung 4-21). Dies würde dafür sprechen, dass geringe Konzentrationen von Galectin-3 ausreichen, um Membranadhäsionen im zellulären Kontext auszubilden, was den starken immunologischen Einfluss des Proteins erklären könnte (Chen *et al.*, 2005). Allerdings konnte bei diesem Versuch die Ligandenkonzentration nicht genau definiert werden, da nur die Vesikelanzahl bestimmt werden konnte und davon ausgegangen wurde, dass in einem Vesikel die gleiche Konzentration an Liganden vorhanden ist. Des Weiteren konnte die Größe durch den *forward scatter* des FACS-Geräts relativ zu der Größe der Zellen definiert werden. Die Vesikel waren ca. um das 100fache kleiner als die Zellen, wobei die Größe der Vesikel um mehrere Zehnerpotenzen streute (s. Abbildung 4-21).

5.4 pH-abhängige Interaktionen von Galectin-3

Der pH-Wert ist entscheidend für physiologische Prozesse in der Zelle. Erhöhte pH-Werte fördern Zellwachstum, Zellzyklus, Differenzierung und Migration (Srivastava *et al.*, 2007). Hierbei können schon geringe Unterschiede im Zytoplasma ein Signal an- bzw. ausschalten. So

wird die Apoptose in einigen Zellen eingeleitet, wenn der pH-Wert um 0,3 pH-Punkte unterhalb des physiologischen pHs von 7,2 liegt (Boussouf *et al.*, 2000). Andererseits sind pH-Schwankungen wichtig, um Rezeptor-vermittelt aufgenommene Proteine in der Zelle wieder frei zu lassen. Als klassisches Beispiel wäre hier Transferrin zu nennen, wobei der pH in diesem Fall stärker als 0,3 Punkte schwankt. Deshalb findet der Vorgang getrennt vom Zytoplasma in Endosomen statt, um nicht ungewollt Apoptose in der Zelle zu induzieren.

Galectin-3 wirkt in endosomalen Kompartimenten und unterstützt dort die Sortierung unterschiedlicher Glykoproteine auf dem Weg zur Plasmamembran. Der pH in diesen Kompartimenten schwankt von pH 5 bis zu neutralem pH an der Oberfläche der Zelle (Weisz 2003). Inwiefern der pH die Bindung von Galectin-3 an seine Liganden beeinflusst, war nicht bekannt. Daher wurden unterschiedliche Liganden untersucht, die sich durch die Komposition der Zucker, die Anzahl der Zuckermoleküle und deren Verzweigung unterscheiden. Hierbei wurde festgestellt, dass der komplexeste Zucker A-Tetra die höchste Affinität an Galectin-3 aufwies, wohingegen der Zucker FucLac einen besseren Zugang zur Bindungstasche des Proteins hatte (s. Abbildung 4-7). Wurden diese Zucker in Abhängigkeit des pHs untersucht, zeigten beide einen Bindungsverlust ab pH 6, wobei die K_d-Werte um das Vierfache (im Fall von pH 5,5) bzw. um das Elf- bis Zwölfwache (im Fall von pH 4) anstiegen. Ebenfalls bestätigten Interaktionsstudien, die Liganden in der Plasmamembran von Zellen untersuchten, dass ab pH 6 die Bindung signifikant verringert wird (s. Abbildung 4-26) und dass ein Galectin-3-bedingtes Clustern des Proteins p75-GFP bei pH 5 nicht induziert wurde (s. Abbildung 4-24). Auch war die Oligomerisierung von Galectin-3 unterhalb eines pHs von 6,5 um bis zu 75 % vermindert. Daher wiesen mehrere Ergebnisse in unterschiedlichen Systemen und mit unterschiedlicher Methodik daraufhin, dass unterhalb eines pHs von 6 sowohl die Bindungsaffinität als auch komplexere Effekte, wie das Clustern von Proteinen oder die Oligomerisierung von Galectin-3, negativ beeinflusst waren.

In der Bindungstasche des Proteins ist ein Histidin an der Stelle 158 vorhanden, dessen Seitenkette unbeeinflusst von anderen Aminosäuren einen pK_s-Wert von 6 aufweist. Dies lässt vermuten, dass genau dieses Histidin an der pH-Sensitivität von Galectin-3 beteiligt ist, da signifikante Unterschiede in den durchgeführten Experimenten (Bindungsnachweis, Oligomerisierung, Membranclusterformierung) unterhalb eines pHs von 6 auftraten. Interessant war, dass nach Generierung einer Histidin-Mutante an der Stelle 158 die Eigenschaft der Bindung zu Lactose komplett verloren ging (Daten nicht gezeigt und Aussagen von Hakon Leffler, Universität Lund, Schweden). Dieser drastische Verlust der Affinität könnte

dahingehen erklärt werden, dass Histidin elementar an der Binding zu seinem Liganden beteiligt ist (s. 2.3.1). Bei genauerer Betrachtung der Elektronendichtewolke der einzelnen Stickstoffe im Histidinrest (s. PDB 3ZSJ) wird ersichtlich, dass der Stickstoff N2 protoniert vorliegt, wohingegen der Stickstoff N1 deprotoniert ist. Ebenfalls ist die Distanz von N2 zu einer benachbarten Hydroxylgruppe eines Aspartatrests exakt die gleiche wie zur benachbarten Hydroxylgruppe zum gebundenen Galactose-Teil des LacNAc. Dies spricht für eine mögliche Salzbrücke mit dem benachbarten Aspartat (s. Abbildung 5-1 und 7.4). Wird nun durch Azidifizierung der Umgebung der Stickstoff N1 protoniert, wird sowohl der Kontakt zur Galactose als auch die Salzbrücke gestört, was den drastischen Bindungsverlust erklären könnte. Weitere Hinweise dafür bietet eine Studie mit Galectin-1, bei der die Histidine zu einem Glutamin mutiert und pH-abhängig untersucht wurden (Hiramatsu, 2013). Es zeigte sich ebenfalls, dass die Mutante H44Q keinerlei Bindung zu dem Liganden Lactose aufwies. Galectin-1 besitzt noch ein zweites Histidin, das am Eingang der Bindungstasche in diese hineinragt. Wurde an dieser Stelle eine Mutation (H52Q) eingefügt, konnte eine verminderte Lactose-Assoziation detektiert werden. In Galectin-3 gibt es vier weitere Histidine (GenBank: BAA22164.1), die in die pH-Sensitivität von Galectin-3 involviert sein könnten, wobei drei davon nicht in der Nähe der Bindungstasche liegen (s. Abbildung 5-1). Das vierte ist in der N-terminalen Domäne lokalisiert, welches durch einen hohen Anteil an Prolinen eine hohe Flexibilität aufweist und daher nicht für Kristallstrukturanalysen verwendet werden kann. Es kann daher sein, dass es bei der Bindung des Zuckerliganden beteiligt ist. Zusätzlich zu diesen vier Histidinen gibt es in Brustkrebszellen eine Mutation an der Stelle 64 von einem Prolin zu einem Histidin, welche eine Resistenz gegen eine Medikamenten-induzierte Apoptose zeigen (Kim *et al.*, 2011). Wurde diese Mutante hinsichtlich des pH-Wertes untersucht, konnte kein Unterschied in der Affinität im Vergleich zur Wildtypvariante von Galectin-3 gemessen werden (mündliche Überlieferung von Michael Carlsson, Universität Lund, Schweden). An dieser Stelle wären weitere Untersuchungen bezüglich der restlichen Histidine in Galectin-3 interessant.

Der Spezifitätenwechsel von Lactose und LacNAc könnte mit den Aminosäuren Glu164, Glu184 und Arg186 erklärt werden. Diese drei Aminosäuren sind am Ausgang der Bindungstaschen von Galectin-3 zu finden und bilden einen engen Kontakt mit den substituierten Gruppen des Glucose-Teils der Lactose bzw. des LacNAc. Ändern sich die Ionenpaarbindungen in diesem Bereich durch eine Ansäuerung, kann dies die Bindung zu dem kompletten Molekül beeinflussen.

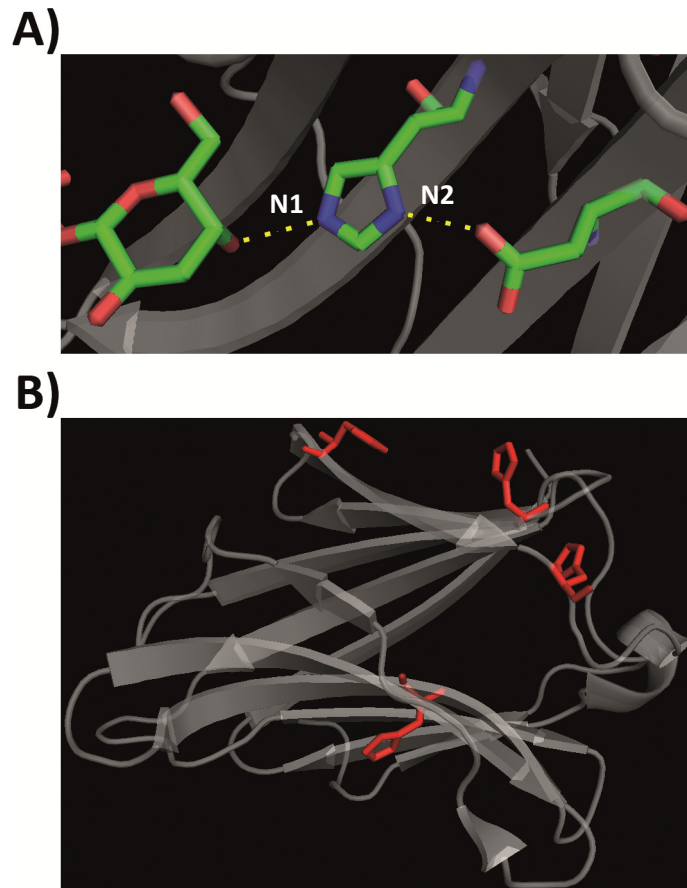


Abbildung 5-1 Strukturelle Darstellung des Einflusses von Histidin in der Bindungstasche von Galectin-3

A) Zu sehen ist die Bindungstasche von Galectin-3 (graue β -Fassstruktur, PDB 2XG3), in der die Reste Histidin 158 (Mitte) und Aspartat 148 (rechts) in der Stabstruktur (Stickstoff N - blau, Kohlenstoff C - grün, Sauerstoff O - rot) dargestellt sind. Zusätzlich ist in der Stabstruktur der Bindungspartner N-Acetyllactosamin (LacNAc) zu erkennen, wobei nur der Galactosidrest zu sehen ist. Berechnet wurde jeweils der Abstand zwischen den jeweiligen Stickstoffatomen im Histidin (N1, N2) und den Sauerstoffatomen des Galactosidrests (links) bzw. des Aspartats (rechts, gestrichelte Linien). Dieser lag in beiden Fällen bei 2,7 Å. **B)** Abgebildet ist die komplette Darstellung der C-terminalen Domäne von Galectin-3 (graue Struktur) mit allen Histidinresten (rote Stabstruktur).

5.5 Zelluläres Recycling von Galectin-3

Im letzten Unterkapitel der Diskussion sollen die Aussagen der vorangegangenen Unterkapitel auf das Zellmodell übertragen werden. Diese Arbeit befasste sich mit *in vitro* Messungen, um die Eigenschaften des Proteins Galectin-3 spezifischer zu analysieren. Parallel haben Kollegen (Tamara Straube, Ellena Hönig, Dominik Schneider und Christoph Greb) den Transport von Galectin-3 in der Zelle näher charakterisiert (Schneider *et al.*, 2010, Straube *et al.*, 2013). So wird Galectin-3 Caveolin- und Zucker-abhängig in die Zelle aufgenommen, kolokalisiert nach wenigen Minuten mit Rab4-positiven Kompartimenten und ist ebenfalls in azideren

Endosomen angereichert. 20 min nach Aufnahme in die Zelle ist es stark in Rab11-positiven Endosomen vorhanden, wohingegen es nicht den Golgi-Apparat durchquert. Rab11 ist ein Marker für das apikale Recycling-Endosom, durch das der biosynthetische mit dem endozytotischen Transportweg verbunden ist. Dass Galectin-3 auch wieder nach Aufnahme in die Zelle und Aufenthalt im apikalen Recycling-Endosom in den biosynthetischen Weg geht, konnten Studien von Ellena Hönig (Straube *et al.*, 2013, Masterarbeit) zeigen, so dass ein Recycling des Proteins als wahrscheinlich gilt. Im biosynthetischen Weg unterstützt Galectin-3 den gezielten Transport unterschiedlicher Glykoproteine. So sinkt die apikale Verteilung des Neurotrophinrezeptors p75 nach Behandlung mit Galectin-3 siRNA von 80 auf 40 % (Delacour *et al.*, 2006a). Des Weiteren zeigten diese Studien, dass Galectin-3 auf einem *Lipid-raft*-unabhängigen Weg von Endosomen zur Plasmamembran gelangt, wohingegen im endozytotischen Transportweg es zusammen mit *raft*-positiven Strukturen in der Zelle vorzufinden ist (Straube *et al.*, 2013).

Zeichnet man diesen Weg der Endozytose, des Recyclen über Endosomen und den Eintritt in den biosynthetischen Weg zur Plasmamembran mit den erlangten Ergebnissen der Arbeitsgruppe und den Erkenntnissen dieser Arbeit nach, kann folgendes Modell von der Wirkung Galectin-3 in der Zelle postuliert werden:

Galectin-3 sitzt an der Oberfläche der Zellen und bindet Liganden mit unterschiedlicher Affinität, wobei komplexere Liganden mit mehreren N-Acetylactosaminen bevorzugt gebunden werden. Hierbei ist Galectin-3 zu anfangs noch im monomeren Zustand. Wird nun von der Zelle eine ausreichende Menge eines gewissen Glykoliganden wie bspw. p75 zur Plasmamembran transportiert, stimuliert dies die Oligomerisierung von Galectin-3, was wiederum zum Clustern des Proteins in der Membran führt. In der Membran könnten einerseits diese Cluster mit Caveolin-positiven Strukturen assoziieren oder aber der Cluster an sich führt in Abhängigkeit der umgebenden Lipide zu einer Membrankrümmung, so dass in beiden Fällen die Endozytose dieses Clusters gefördert werden würde. Danach gelangt Galectin-3 in Rab4-positive Kompartimente, in denen ein pH zwischen 5,5 und 6 vorherrscht. Der pH-Wechsel führt einerseits zum Auflösen des Oligomers und damit des Clusters und andererseits wird die Bindung zum Glykoliganden geschwächt. Zusätzlich wechselt die Spezifität zu Sulfatiden und einfacheren Zuckerliganden wie Lactose, wodurch am Ende die Ablösung des endozytierten Glykoliganden erreicht werden könnte. Im weiteren Verlauf gelangt Galectin-3 in das apikale Recycling-Endosom (ARE) und weitergehend in das *trans golgi network* (TGN), in denen ein pH von 6,5 vorliegt. Bei diesem pH können komplexere Liganden

wieder gleich affin binden und bei einer gewissen Ligandenkonzentration kann das Oligomer erneut ausgebildet werden. Der nächste Schritt allerdings, der begründen könnte, weshalb Galectin-3 die Bindung zu *lipid-raft*-unabhängigen Proteinen bevorzugt, ist schwer zu verstehen. Hierbei könnten zum einen die umgebenden Lipide, die eine andere Komposition als in Caveolin-positiven Strukturen besitzen, eine wesentliche Rolle spielen. Weiterhin sind die Krümmungseigenschaften der Membran in einem Endosom unterschiedlich zu denen an der Plasmamembran, da beide Membranen unterschiedlich stark verformt sind. Wird dann im weiteren Verlauf der Glykoligand in der Membran geclustert und damit die Abknospung eines Vesikels aus dem ARE bzw. TGN gefördert, gelangt Galectin-3 wieder zur Plasmamembran. Der Transport könnte hierbei über sekretorische Vesikel verlaufen, von denen bekannt ist, dass sie während ihres Reifeprozesses angesäuert werden (Urbé *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 2001). Diese Vesikel sind angereichert an Galectin-3 (Mehul *et al.*, 1997, Menon *et al.*, 1999) und eine pH-Senkung würde die Interaktion zum Liganden lösen und Galectin-3 könnte nach Fusion mit der Plasmamembran an neue Liganden binden und der Zyklus kann von vorne beginnen (s. Abbildung 5-2).

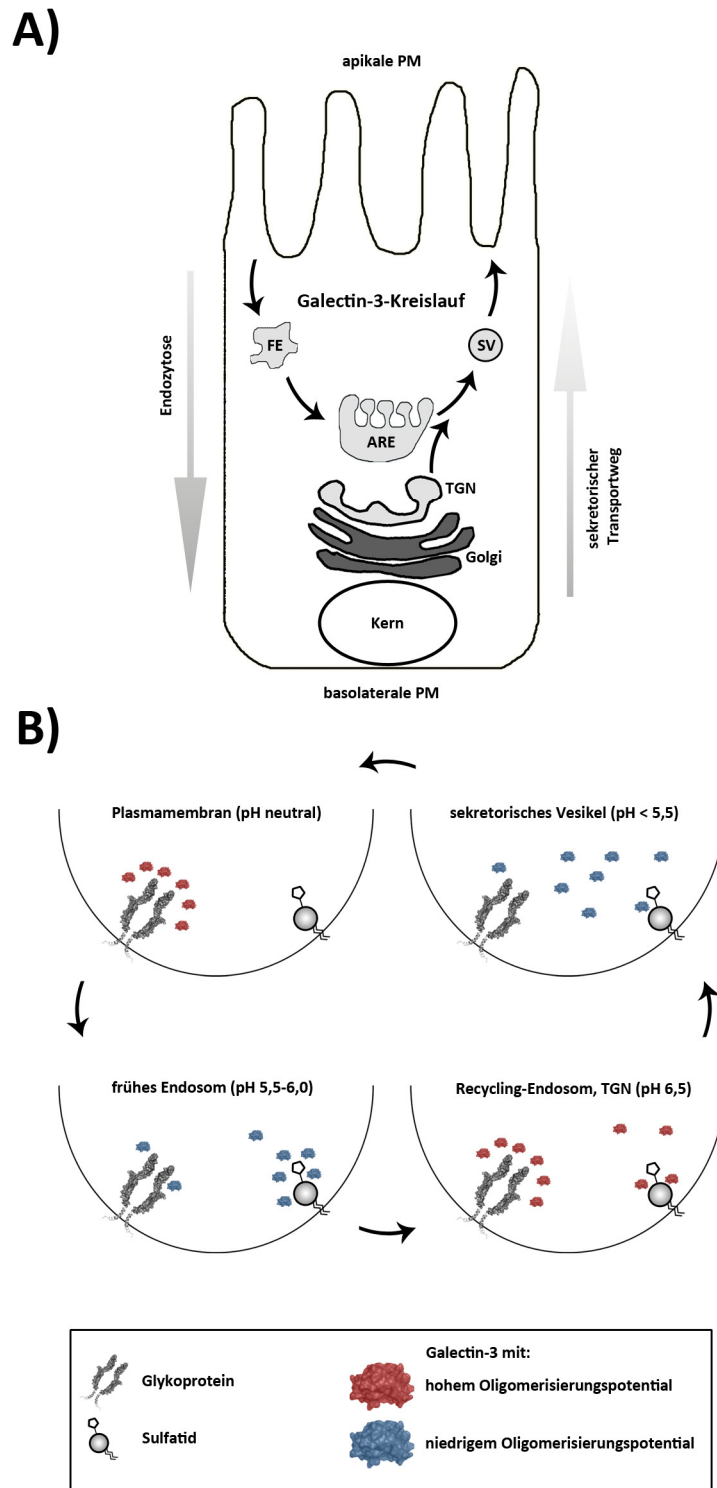


Abbildung 5-2 Modell des Recyclings von Galectin-3 in der Zelle

A) frühes Endosom - FE, apikales Recycling-Endosom - ARE, *trans golgi network* - TGN, sekretorisches Vesikel - SV, Plasmamembran - PM. B) *trans golgi network* - TGN

5.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch detaillierte biochemische, strukturelle, theoretische und zellbiologische Untersuchungen neue Beiträge zum grundlegenden Verständnis der Spezifitäten von Galectin-3 erarbeitet werden. Es wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung und die Oligomerisierung des Proteins analysiert und wechselnde funktionelle Rollen des Proteins in Abhängigkeit des pHs identifiziert.

Der Schlüssel dieser Untersuchungen baut auf der Interaktion von Galectin-3 zu einem Zucker auf. Daher wurde die Bindung zu unterschiedlichen Sacchariden charakterisiert, wobei die Komplexität der Glykosylierungen in der Zelle nur im Ansatz untersucht werden konnte. Hier wären weitergehende Studien interessant, die die genaue Zuckerstruktur von Liganden, die in der Zelle an Galectin-3 binden, bestimmen könnten. Dies bedingt eine Glycom-weite massenspektrometrische Analyse von Bindungspartnern, die aus einem Zelllysats mit Hilfe einer Galectin-3-beschichteten Matrix isoliert werden. Voruntersuchungen mit spezifischen Inhibitoren gegen Glykosyltransferasen von Proteinen und Lipiden könnten dabei die Spezifität von Galectin-3 eingrenzen.

Aufbauend auf den *in vitro* Studien der Oligomerisierung, die stark pH-abhängig verläuft, wäre spannend zu sehen, inwiefern sich das Protein in angesäuerten Kompartimenten der Zelle verhält. Dies könnte mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen umgesetzt werden, bei denen der Verlauf von rekombinantem Galectin-3 in der Zelle verfolgt wird. Hierbei müsste einerseits zwischen den Kompartimenten der Zelle unterschieden und andererseits Galectin-3 als Mono- bzw. Oligomer auseinander gehalten werden. Dies könnte mit Hilfe von Nanogoldpartikeln verwirklicht werden, die über eine Markierung mit dem Protein verbunden wären.

Durch Verwendung eines nativen Membranmodells wurde die Akkumulation von Glykoproteinen, die in der Lipidschicht saßen, visualisiert und charakterisiert. Hier wären aufbauende Studien interessant, die die Membraneigenschaften während der Akkumulation bestimmen könnten. Eine Anreicherung eines Liganden müsste direkte Auswirkungen auf die Fluidität, Rigidität und Krümmungsenergie von Membranen haben. Eine gezielte Zugabe von Lipiden, die diese Eigenschaften beeinflussen, könnte daher nähere Einblicke in die zelluläre Wirkung von Galectin-3 erbringen.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmad N, Gabius H, André S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF: **Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes.** J. Biol. Chem. 279 (2004a) 10841-10847.
- Ahmad N, Gabius H, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF: **Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3.** Glycobiology 14 (2004b) 817-825.
- Ali MH, Imperiali B: **Protein oligomerization: how and why.** Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 5013-5020.
- Ambroggio EE, Sillibourne J, Antonny B, Manneville J, Goud B: **Arf1 and membrane curvature cooperate to recruit Arfaptin2 to liposomes.** PLoS ONE 8 (2013) e62963.
- Apodaca G, Katz LA, Mostov KE: **Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes.** J. Cell Biol. 125 (1994) 67-86.
- Apodaca G, Gallo LI, Bryant DM: **Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry.** Nat. Cell Biol. 14 (2012) 1235-1243.
- Bacallao R, Antony C, Dotti C, Karsenti E, Stelzer EH, Simons K: **The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium.** J. Cell Biol. 109 (1989) 2817-2832.
- Baumgart T, Hammond AT, Sengupta P, Hess ST, Holowka DA, Baird BA, Webb WW: **Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (2007) 3165-3170.
- Birnboim HC, Doly J: **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513-1523.
- Blom T, Somerharju P, Ikonen E: **Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids.** Cold Spring Harb Perspect Biol 3 (2011) a004713.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH: **A genomic perspective on membrane compartment organization.** Nature 409 (2001) 839-841.
- Bogoeva VP, Varriale A, John CM, D'Auria S: **Human galectin-3 interacts with two anticancer drugs.** Proteomics 10 (2010) 1946-1953.
- Boussouf A, Gaillard S: **Intracellular pH changes during oligodendrocyte differentiation in primary culture.** J. Neurosci. Res. 59 (2000) 731-739.
- Brown DA, London E: **Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?** Biochem. Biophys. Res. Commun. 240 (1997) 1-7.
- Brown DA, Rose JK: **Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.** Cell 68 (1992) 533-544.

- Cai M, Zhao W, Shang X, Jiang J, Ji H, Tang Z, Wang H: **Direct evidence of lipid rafts by in situ atomic force microscopy.** *Small* 8 (2012) 1243-1250.
- Canton I, Battaglia G: **Endocytosis at the nanoscale.** *Chem Soc Rev* 41 (2012) 2718-2739.
- Carlsson S, Carlsson MC, Leffler H: **Intracellular sorting of galectin-8 based on carbohydrate fine specificity.** *Glycobiology* 17 (2007) 906-912.
- Casanova JE, Apodaca G, Mostov KE: **An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor.** *Cell* 66 (1991) 65-75.
- Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD: **Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support.** *J. Cell Biol.* 77 (1978) 853-880.
- Chen HY, Liu F, Yang R: **Roles of galectin-3 in immune responses.** *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 53 (2005) 497-504.
- Cooper DNW: **Galectinomics: finding themes in complexity.** *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 209-231.
- Cramm-Behrens CI, Dienst M, Jacob R: **Apical cargo traverses endosomal compartments on the passage to the cell surface.** *Traffic* 9 (2008) 2206-2220.
- Cumpstey I, Salomonsson E, Sundin A, Leffler H, Nilsson UJ: **Studies of arginine-arene interactions through synthesis and evaluation of a series of galectin-binding aromatic lactose esters.** *Chembiochem* 8 (2007) 1389-1398.
- Debierre-Grockiego F, Niehus S, Coddeville B, Ellass E, Poirier F, Weingart R, Schmidt RR, Mazurier J, Guérardel Y, Schwarz RT: **Binding of Toxoplasma gondii glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages.** *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 32744-32750.
- Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R: **Requirement for galectin-3 in apical protein sorting.** *Curr. Biol.* 16 (2006a) 408-414.
- Delacour D, Gouyer V, Zanetta J, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau-Hannedouche O, Maes E, Pons A, André S, Le Bivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K, Huet G: **Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells.** *J. Cell Biol.* 169 (2005) 491-501.
- Delacour D, Greb C, Koch A, Salomonsson E, Leffler H, Le Bivic A, Jacob R: **Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering.** *Traffic* 8 (2007) 379-388.
- Delacour D, Jacob R: **Apical protein transport.** *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006b) 2491-2505.
- Delacour D, Koch A, Ackermann W, Eude-Le Parco I, Elsässer H, Poirier F, Jacob R: **Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo.** *J. Cell. Sci.* 121 (2008) 458-465.
- Duffield A, Caplan MJ, Muth TR: **Protein trafficking in polarized cells.** *Int Rev Cell Mol Biol* 270 (2008) 145-179.
- Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD: **The MDCK variety pack: choosing the right strain.** *BMC Cell Biol.* 12 (2011) 43.

- Ehrlich M, Boll W, van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, Kirchhausen T: **Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits.** Cell 118 (2004) 591-605.
- Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A: **Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.** Biochim. Biophys. Acta 71 (1963) 377-391.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley, G H: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** J. Biol. Chem. 226 (1957) 497-509.
- Fölsch H, Pypaert M, Maday S, Pelletier L, Mellman I: **The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains.** J. Cell Biol. 163 (2003) 351-362.
- Frick M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ: **Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding.** Curr. Biol. 17 (2007) 1151-1156.
- Futerman AH, Hannun YA: **The complex life of simple sphingolipids.** EMBO Rep. 5 (2004) 777-782.
- Gregson NA: **The extraction and analysis of glycosphingolipids.** Methods Mol. Biol. 19 (1993) 287-301.
- Hannan LA, Lisanti MP, Rodriguez-Boulon E, Edidin M: **Correctly sorted molecules of a GPI-anchored protein are clustered and immobile when they arrive at the apical surface of MDCK cells.** J. Cell Biol. 120 (1993) 353-358.
- Hansen CG, Nichols BJ: **Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis.** J. Cell. Sci. 122 (2009) 1713-1721.
- Hansson GC, Simons K, van Meer G: **Two strains of the Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line have distinct glycosphingolipid compositions.** EMBO J. 5 (1986) 483-489.
- Hell S.W., Kroug M.: **Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit.** Applied Physics B 60 (1995) 495-497.
- Hirabayashi J, Kasai K: **The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution.** Glycobiology 3 (1993) 297-304.
- Holowka D, Gosse JA, Hammond AT, Han X, Sengupta P, Smith NL, Wagenknecht-Wiesner A, Wu M, Young RM, Baird B: **Lipid segregation and IgE receptor signaling: a decade of progress.** Biochim. Biophys. Acta 1746 (2005) 252-259.
- Horlacher T, Oberli MA, Werz DB, Kröck L, Bufali S, Mishra R, Sobek J, Simons K, Hirashima M, Niki T, Seeberger PH: **Determination of carbohydrate-binding preferences of human galectins with carbohydrate microarrays.** Chembiochem 11 (2010) 1563-1573.
- Hua W, Sheff D, Toomre D, Mellman I: **Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging.** J. Cell Biol. 172 (2006) 1035-1044.
- Hughes AR, Putney JW: **Metabolism and functions of inositol phosphates.** Biofactors 1 (1988) 117-121.

- Hunziker W, Harter C, Matter K, Mellman I: **Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant.** Cell 66 (1991) 907-920.
- Huotari J, Helenius A: **Endosome maturation.** EMBO J. 30 (2011) 3481-3500.
- Ideo H, Seko A, Ishizuka I, Yamashita K: **The N-terminal carbohydrate recognition domain of galectin-8 recognizes specific glycosphingolipids with high affinity.** Glycobiology 13 (2003) 713-723.
- Ikonen E, Simons K: **Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells.** Semin. Cell Dev. Biol. 9 (1998) 503-509.
- Jacob R, Preuss U, Panzer P, Alfalah M, Quack S, Roth MG, Naim H, Naim HY: **Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin.** J. Biol. Chem. 274 (1999) 8061-8067.
- Keller H, Lorzate M, Schwille P: **PI(4,5)P₂ degradation promotes the formation of cytoskeleton-free model membrane systems.** Chemphyschem 10 (2009) 2805-2812.
- Keppler A, Kindermann M, Gendreizig S, Pick H, Vogel H, Johnsson K: **Labeling of fusion proteins of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro.** Methods 32 (2004) 437-444.
- Kim S, Shin J, Cheong T, Choi I, Lee YS, Park SH, Chun K: **Galectin-3 germline variant at position 191 enhances nuclear accumulation and activation of β -catenin in gastric cancer.** Clin. Exp. Metastasis 28 (2011) 743-750.
- Kopitz J, Ballikaya S, André S, Gabius H: **Ganglioside GM1/galectin-dependent growth regulation in human neuroblastoma cells: special properties of bivalent galectin-4 and significance of linker length for ligand selection.** Neurochem. Res. 37 (2012) 1267-1276.
- Kopitz J, Reitzenstein C von, Burchert M, Cantz M, Gabius HJ: **Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture.** J. Biol. Chem. 273 (1998) 11205-11211.
- Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227 (1970) 680-685.
- Lapierre LA, Kumar R, Hales CM, Navarre J, Bhartur SG, Burnette JO, Provance DW, Mercer JA, Bähler M, Goldenring JR: **Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems.** Mol. Biol. Cell 12 (2001) 1843-1857.
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F: **Introduction to galectins.** Glycoconj. J 19 (2004) 433-440
- Lepur A, Salomonsson E, Nilsson UJ, Leffler H: **Ligand induced galectin-3 protein self-association.** J. Biol. Chem. 287 (2012) 21751-21756.
- Levental I, Grzybek M, Simons K: **Raft domains of variable properties and compositions in plasma membrane vesicles.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108 (2011) 11411-11416.
- Lin S, Naim HY, Rodriguez AC, Roth MG: **Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells.** J. Cell Biol. 142 (1998) 51-57.

- Lingwood D, Binnington B, Róg T, Vattulainen I, Grzybek M, Coskun U, Lingwood CA, Simons K: **Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity.** *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 260-262.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Faar AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- Lukin JA, Ho C: **The structure--function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution.** *Chem. Rev.* 104 (2004) 1219-1230.
- Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J: **Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 1031-1036.
- Maccioni, Hugo J F: **Glycosylation of glycolipids in the Golgi complex.** *J. Neurochem.* 103 Suppl 1 (2007) 81-90.
- Marsh D: **Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams.** *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 2114-2123.
- Mattila PE, Kinlough CL, Bruns JR, Weisz OA, Hughey RP: **MUC1 traverses apical recycling endosomes along the biosynthetic pathway in polarized MDCK cells.** *Biol. Chem.* 390 (2009) 551-556.
- Maxfield FR, van Meer G: **Cholesterol, the central lipid of mammalian cells.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (2010) 422-429.
- Mayle KM, Le AM, Kamei DT: **The intracellular trafficking pathway of transferrin.** *Biochim. Biophys. Acta* 1820 (2012) 264-281.
- Mayor S, Riezman H: **Sorting GPI-anchored proteins.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 110-120.
- Meer G van, Vaz, Winchil L C: **Membrane curvature sorts lipids. Stabilized lipid rafts in membrane transport.** *EMBO Rep.* 6 (2005) 418-419.
- Mehul B, Hughes RC: **Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion.** *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 10) (1997) 1169-1178.
- Menon RP, Hughes RC: **Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex.** *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 569-576.
- Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP: **The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites.** *J. Immunol.* 156 (1996) 1572-1577.
- Meyer HW: **The occurrence of phase separation structures in biological membranes as derived from freeze-etch observations.** *Acta Histochem. Suppl.* 23 (1981) 189-194.
- Meyer HW: **Lipid domain structures in biological membranes.** *Exp Pathol* 23 (1983) 3-26.
- Misfeldt DS, Hamamoto ST, Pitelka DR: **Transepithelial transport in cell culture.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (1976) 1212-1216.

- Mishra R, Grzybek M, Niki T, Hirashima M, Simons K: **Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107 (2010) 17633-17638.
- Mostov KE: **Transepithelial transport of immunoglobulins.** Annu. Rev. Immunol. 12 (1994) 63-84.
- Mouritsen OG: **Model answers to lipid membrane questions.** Cold Spring Harb Perspect Biol 3 (2011) a004622.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1 (1986) 263-273.
- Munro S: **Lipid rafts: elusive or illusive?** Cell 115 (2003) 377-388.
- Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S: **Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer.** J. Biol. Chem. 282 (2007) 1374-1383.
- Pierce SK: **Lipid rafts and B-cell activation.** Nat. Rev. Immunol. 2 (2002) 96-105.
- Pike LJ: **Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function.** J. Lipid Res. 47 (2006) 1597-1598.
- Raucher D, Sheetz MP: **Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension.** Biophys. J. 77 (1999) 1992-2002.
- Rodriguez-Boulán E, Kreitzer G, Müsch A: **Organization of vesicular trafficking in epithelia.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6 (2005) 233-247.
- Rodriguez-Boulán E, Nelson WJ: **Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype.** Science 245 (1989) 718-725.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, Russell D: **Molecular cloning : a laboratory manual.** 3. ed Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- Sampaio JL, Gerl MJ, Klose C, Ejsing CS, Beug H, Simons K, Shevchenko A: **Membrane lipidome of an epithelial cell line.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108 (2011) 1903-1907.
- Sato S, Hughes RC: **Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages.** J. Biol. Chem. 269 (1994) 4424-4430.
- Scheiffele P, Peränen J, Simons K: **N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells.** Nature 378 (1995) 96-98.
- Schneider D, Greb C, Koch A, Straube T, Elli A, Delacour D, Jacob R: **Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells.** Eur. J. Cell Biol. 89 (2010) 788-798.
- Schwudke D, Oegema J, Burton L, Entchev E, Hannich JT, Ejsing CS, Kurzchalia T, Shevchenko A: **Lipid profiling by multiple precursor and neutral loss scanning driven by the data-dependent acquisition.** Anal. Chem. 78 (2006) 585-595.
- Scott RE: **Plasma membrane vesiculation: a new technique for isolation of plasma membranes.** Science 194 (1976) 743-745.

- Shaw AS: **Lipid rafts: now you see them, now you don't.** Nat. Immunol. 7 (2006) 1139-1142.
- Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** Nature 387 (1997) 569-572.
- Simons K, van Meer G: **Lipid sorting in epithelial cells.** Biochemistry 27 (1988) 6197-6202.
- Sörme P, Qian Y, Nyholm P, Leffler H, Nilsson UJ: **Low micromolar inhibitors of galectin-3 based on 3'-derivatization of N-acetyllactosamine.** Chembiochem 3 (2002) 183-189.
- Southern EM: **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** J. Mol. Biol. 98 (1975) 503-517.
- Spodisberg N, Jacob R, Alfalah M, Zimmer KP, Naim HY: **Molecular basis of aberrant apical protein transport in an intestinal enzyme disorder.** J. Biol. Chem. 276 (2001) 23506-23510.
- Srivastava J, Barber DL, Jacobson MP: **Intracellular pH sensors: design principles and functional significance.** Physiology (Bethesda) 22 (2007) 30-39.
- Stenmark H: **Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10 (2009) 513-525.
- Straube T, Mach T von, Hönig E, Greb C, Schneider D, Jacob R: **pH-Dependent Recycling of Galectin-3 at the Apical Membrane of Epithelial Cells.** Traffic (2013).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** 1979. Biotechnology 24 (1992) 145-149.
- Urbé S, Dittié AS, Tooze SA: **pH-dependent processing of secretogranin II by the endopeptidase PC2 in isolated immature secretory granules.** Biochem. J. 321 (Pt 1) (1997) 65-74.
- Weisz OA: **Acidification and protein traffic.** Int. Rev. Cytol. 226 (2003) 259-319.
- Weisz OA, Rodriguez-Boulan E: **Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors.** J. Cell. Sci. 122 (2009) 4253-4266.
- Wu MM, Grabe M, Adams S, Tsien RY, Moore HP, Machen TE: **Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway.** J. Biol. Chem. 276 (2001) 33027-33035.
- Wright EM: **Renal Na(+)-glucose cotransporters.** Am. J. Physiol. Renal Physiol. 280 (2001) F10-8.
- Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E: **The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells.** J. Cell Biol. 139 (1997) 929-940.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7-1 Abkürzungen

Abkürzungen	Ausgeschriebene Begriffe
°C	Grad Celcius
AEE	Frühes apikales Endosom (<i>apical early endosome</i>)
AP	Adaptorprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Apikales Recyclingendosom
ARF	<i>ADP ribosylation factor</i>
AS	Aminosäure
BEE	Frühes basolaterales Endosom (<i>basolateral early endosome</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
Bspw	beispielsweise
CDC	<i>cyclin division cycle</i>
C/G/YFP	<i>cyan/green/yellow fluorescent protein</i>
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
CRE	Gemeines Recyclingendosom (<i>common recycling endosome</i>)
DEAE	Diethylaminoethanol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRM	Detergenzien-resistente Membran (<i>detergent-resistant membrane</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure

HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
KLSM	Konfokales <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop
Laser	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LB	Lysogeny Broth
M	Molar (mol/l)
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney (cells)</i>
mdeg	<i>millidegree</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium Eagle</i>
Min	Minute
mk	monoklonal
MT	Mikrotubuli
MW	Atomare Masse (molecular weight)
o.g.	oben genannt
P75-NTR	Neurotrophinrezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Proteinase-Inhibitoren
pk	polyklonal
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSG	Penicillin, Streptomycin, Glutamin
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SI	Saccharase-Isomaltase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
v/v	volume in volume

w/v	weight in volume
WT	Wildtyp

Tabelle 7-2 Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	M (g/mol)
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer des Fachbereichs Humanmedizin und im Studiengang Humanbiologie an der Phillips-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren:

Aigner, Bauer U., Bauer S., Boekhoff, Brehm, Daut, Eilers, Elsässer, Essen, Frenking, Garten, Hasilik, Hassel, Jacob, Jungclas, Kirchner, Koolman, Lill, Löffler M., Löffler G., Lohoff, Maisner, Müller, Plant, Röhm, Schäfer, Seitz, Suske, Voigt, Weihe

7.3 Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Ralf Jacob für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung während der Promotionszeit. Ich bin sehr dankbar, dass ich den nötigen Freiraum bekommen habe, um neue Ideen zu entwickeln und diese in Kooperationen im In- und Ausland umsetzen zu können.

Ein riesiges Lob möchte ich gerne den Organisatoren des Graduiertenkollegs 1216 aussprechen, an dem ich teilnehmen durfte. Durch die finanzielle Unterstützung wären die Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen nicht möglich gewesen und durch die Seminare konnte ich Kontakte knüpfen, um mich methodisch und inhaltlich mit anderen Doktoranden auszutauschen. Hier bedanke ich mich recht herzlich bei Lucette Claudet und Prof. Dr. Uwe Maier.

Weiterhin gilt mein Dank der kompletten Arbeitsgruppe Jacob, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, da sie immer für Diskussionen ein offenes Ohr hatte. Im Besonderen möchte ich Martina Dienst und Waltraud Ackermann danken, da sie sowohl praktisch als auch administrativ einen wesentlichen Teil dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit effizienter umgesetzt werden konnte.

Während der Promotion hatte ich die Möglichkeit neben der eigenen Arbeitsgruppe mit drei weiteren AGs zusammenzuarbeiten, um mein Projekt voranzubringen. Zum einen möchte ich die AG Simons aus Dresden nennen, durch die meine Ideen fokussiert und die methodische Ausführung von Experimenten präzisiert wurden. Hier möchte ich ganz besonders Ünal Coskun, Michal Grzybek und Tomasz Buhl danken. Weiterhin danke ich der AG Leffler aus Lund, durch die mein Verständnis über Galectine vertieft wurde. Daher möchte ich Barbro Kahl Knutson und Michael Carlsson für die einzigartige experimentelle Unterstützung danken und Hakon Leffler für eine mitreißende Faszination in die Welt des Galectin-3. Zuletzt gilt mein Dank der AG Johannes aus Paris, da sie mich in die Methode der GUV-Synthese eingeführt haben und die eine neue Wirkweise von Galectin-3 aufgedeckt haben, die das komplette Galectinfeld neu beleben wird.

Ebenfalls möchte Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer danken, da er für mich immer ein offenes Ohr hatte und ich Teile meiner Arbeit mit ihm kritisch besprechen konnte, um die Ergebnisse zu verbessern.

Der kompletten AG Lill danke ich für die Bereitstellung und die Einführung in unterschiedlichste Geräte wie CD-Spektroskopie und Durchflusszytometer. Hier sei hervorgehoben Holger Webert, Ulrich Mühlenhoff, Antonio Pierik und Oliver Stehling, die mich geduldig eingewiesen haben.

Prof. Dr. Jan Koolman danke ich für die Nutzung eines Rotationsvaporisators, da solche Geräte nur noch selten in der Zellbiologie Anwendung finden.

Die Firma Leica Microsystems hat durch Beantwortung von technischen Fragen und Nutzung neuester Mikroskope dazu beigetragen, die Auflösung einiger Bilder dieser Arbeit zu verbessern. Dafür möchte ich mich bei Herrn Ulf Schwarz (Applikationsspezialist) und Christian May (Produktmanager) bedanken. Ebenfalls möchte ich mich für die Bereitstellung eines Diagramms für die Beschreibung der GSDIM-Technologie bei Frau Anja Schue bedanken.

Dank Dominik Schneider, Ellena Hönig, Lucia von Mach und Larissa Spiegelberg konnte diese Arbeit so fehlerfrei wie möglich umgesetzt werden. Vielen Dank euch dafür.

Tamara Straube danke ich für die schöne Zeit in Denver und Lund, bei der wir viel Spaß hatten und erfolgreich arbeiten konnten.

Ralf Rösser möchte ich für die etlichen Diskussionen über Fußball und das Leben während der Kaffeepausen danken.

Sabrina Zink und Ellena Hönig danke ich für die sehr humorvollen Tage neben der Arbeit.

Dominik Schneider hat schon immer gewusst, wann der richtige Zeitpunkt war, einen mit seinen interessanten Witzen zum Lachen zu bringen. Weiterhin konnte ich mit ihm wissenschaftlich über vieles diskutieren, auch wenn wir nicht immer einer Meinung waren. Hierbei möchte ich besonders das NFS-Projekt erwähnen, bei dem wir fast schon einem Wettkampf gleich unsere eigenen Standpunkte vertraten. Vielen Dank dafür!

Meinen Kaffeejungs (Holger Webert und Christoph Greb) kann ich mit Worten nicht beschreiben, wie wichtig die täglichen Pausen waren, die ich mit ihnen verbringen durfte und wie schwer das letzte Jahr ohne diese Pausen war. Wir haben viel gelacht und alltägliche Probleme besprochen.

Meiner kompletten Familie danke ich für die Unterstützung aus der Ferne. Sie waren für mich mein Ruhepol der Entspannung in stürmischen Zeiten während der Promotion.

Und zum Schluss möchte ich meiner Freundin danken, da sie lange Diskussionen über die Arbeit auch zu Hause ertragen musste und sie dabei immer geduldig blieb. Sie half mir, auch schwierige Zeiten besser zu überwinden.

7.4 Kalkulierte Salzbrücken in der Bindungstasche von Galectin-3

Um den Effekt des pH-Wertes von Galectin-3 besser zu verstehen, wurden mit Hilfe einer Software die theoretischen Salzbrücken in dem Protein berechnet. Die Analyse erfolgte hierbei mit dem Programm VMD (*Visual Molecular Dynamics*) in der Version 1.9. Verwendet wurden die Strukturdaten aus der PDB-Datenbank mit der Nummer 3ZSJ, wobei an folgenden Stellen eine potentielle Salzbrücke gefunden wurde:

1. Glu 184 mit Arg 186
2. Glu 165 mit Arg 162
3. Glu 205 mit His 208
4. Asp 215 mit Lys 199
5. Glu 193 mit Arg 169
6. Glu 230 mit Arg 151
7. **Asp 148 mit His 158 (s. Diskussion)**
8. Glu 185 mit Arg 224
9. Glu 165 mit Arg 186
10. Glu 205 mit Lys 210

7.5 Zuckerstrukturen

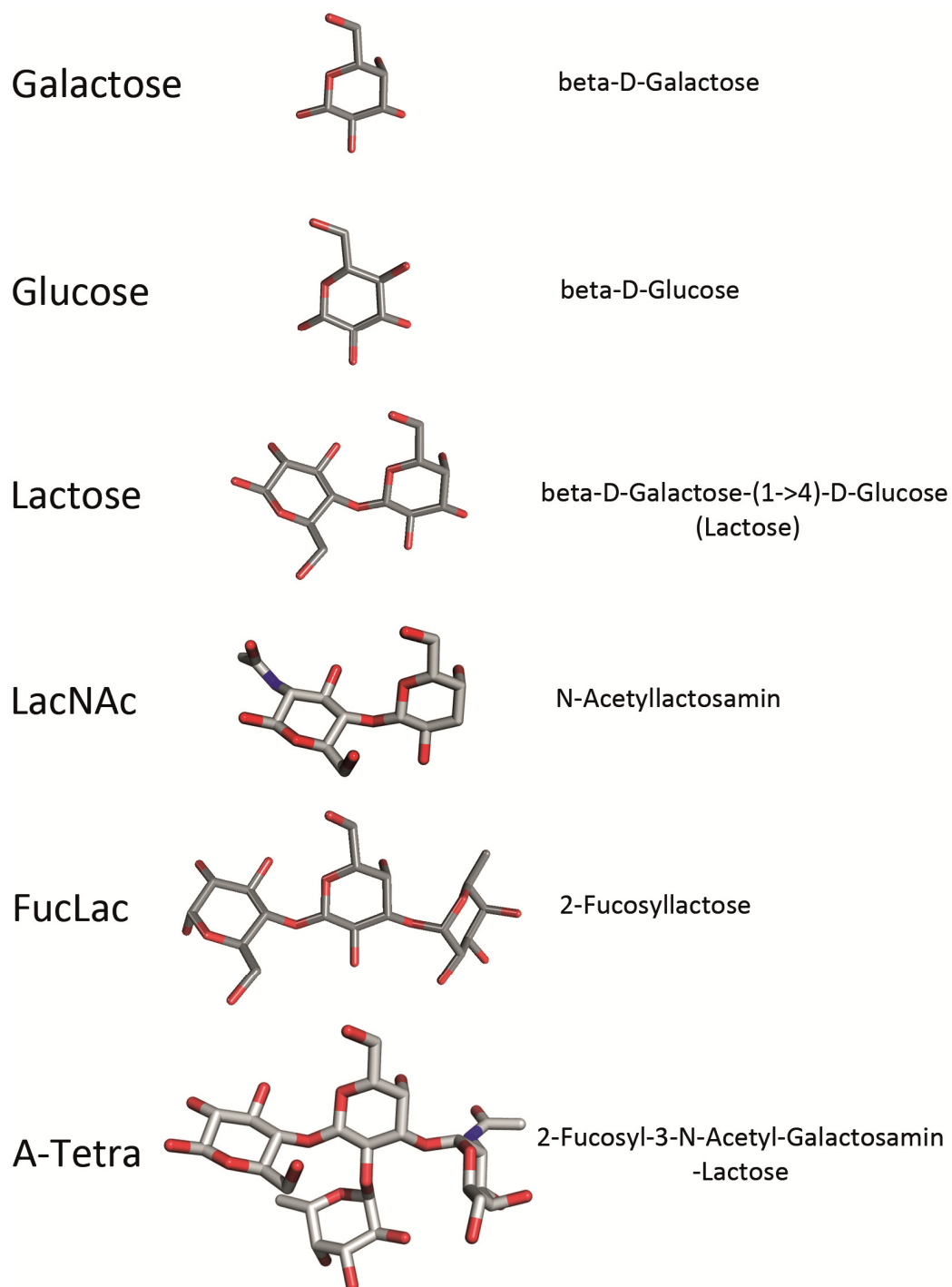


Abbildung 7-1 Dreidimensionale Struktur der verwendeten Saccharide

Kohlenstoff - C - grau, Sauerstoff - O - rot, Stickstoff - N - blau

7.6 Daten, die in Kooperation oder durch Betreuung von Studenten entstanden sind

1. Die Abbildung 4-7, Abbildung 4-8, Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12 wurden zu gleichen Teilen mit Tamara Straube zusammen in Lund durchgeführt. Dies geschah im Rahmen des Kooperationsprojekts mit der AG Leffler (Universität Lund, Schweden) zur Bestimmung der pH-abhängigen Bindung von Galectin-3 mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation.

2. Durchgeführt von Dr. Michael Carlsson (Universität Lund, Schweden):

von Mach T, Carlsson M, Straube T, Nilsson U, Leffler H und Jacob R: **Ligand binding and complex formation of Galectin-3 is modulated by pH variations.** In Revision (2013).

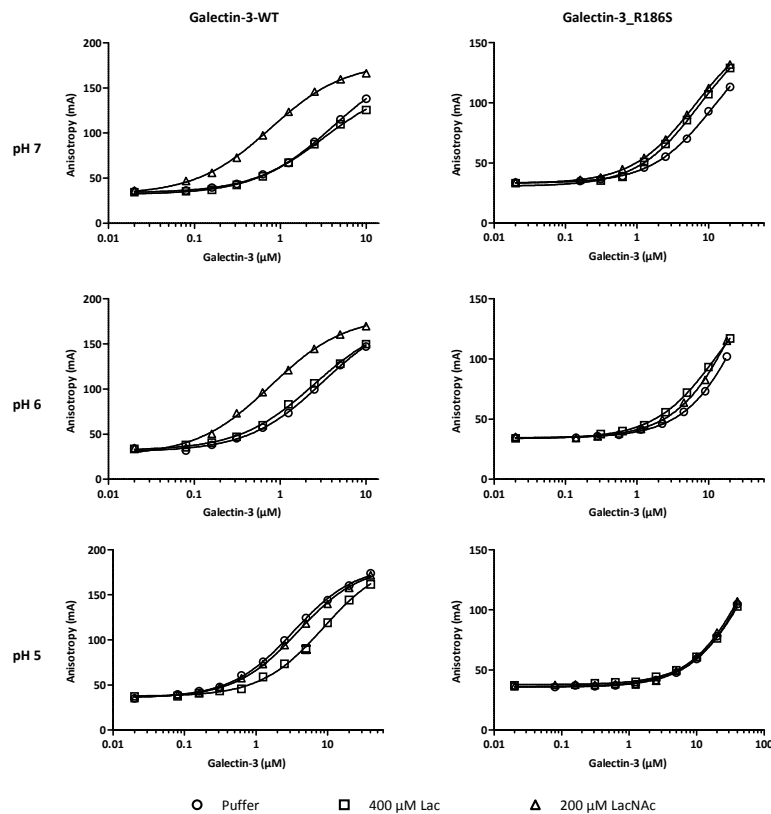
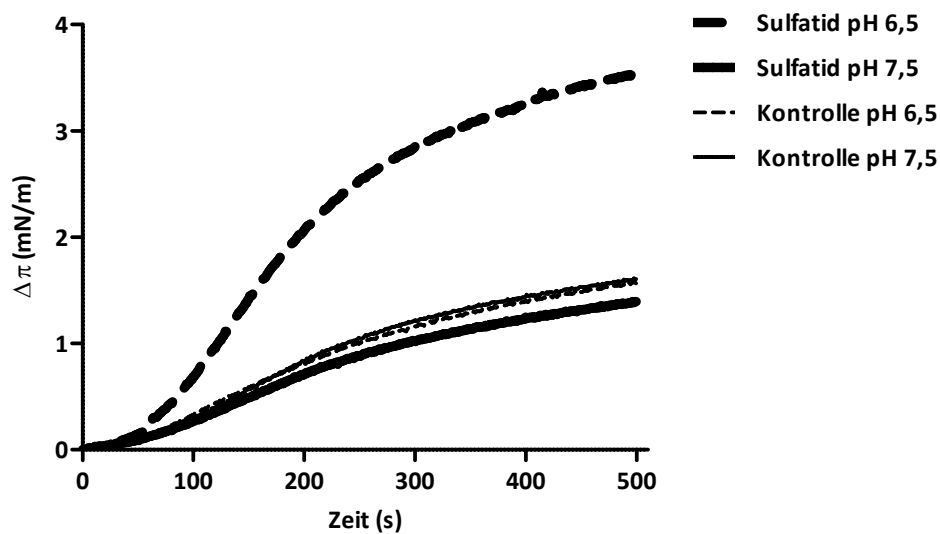


Abbildung 7-2 pH-abhängige Inhibition der Bindung zwischen Galectin-3 und A-Tetra mittels Lac und LacNAc

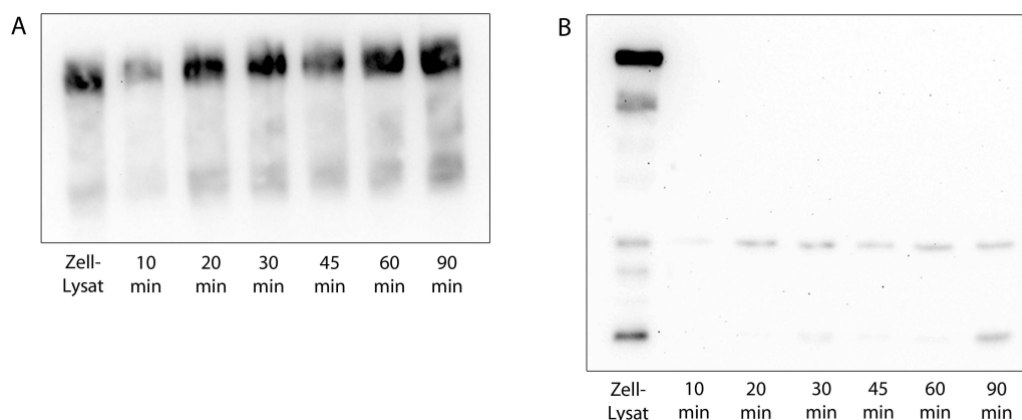
Dargestellt sind Bindungskinetiken von Galectin-3 mit dem Zucker A-Tetra, die bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde der Inhibitor Lactose (Lac, 400 µM) und N-Acetyllactosamin (LacNAc, 200 µM) hinzugegeben, wobei die Konzentration des Liganden A-Tetra bei konstant 0,1 µM lag und Galectin-3 in aufsteigender Konzentration hinzupipettiert wurde. Die Messung erfolgte direkt nach Zugabe des Proteins zu dem Zucker und wurde mit einem Pherastar FS Plattenlesegerät durchgeführt. Die Nicht-lineare Regression erfolgte durch GraphPad Prism.

3. Durchgeführt von Tomasz Buhl (MPI-CBG Dresden):

**Abbildung 7-3 pH-abhängige Sulfatidinteraktion von Galectin-3**

Der einschichtige Lipidfilm wurde geformt auf einer hydrophilen Oberfläche mit einer Konzentration von 0,05 mg/mL von Lipiden. Nach Äquilibration für 1 h wurde der hydrophile Puffer subtopisch mit 0,5 μ M Galectin-3 versetzt und die Veränderungen der Oberflächenspannung ($\Delta\pi$) gemessen. An Lipiden wurden POPC und Cholesterol als Kontrolle (dünne Linien) oder zusätzlich mit 1 mol% Sulfatiden (dicke Linien) verwendet. Experimente wurden durchgeführt bei pH 7,5 (durchgehende Linien) und pH 6,5 (gestrichelte Linien). Gemittelte Werte von drei unabhängigen Experimenten sind angezeigt.

4. Durchgeführt von Wymke Ockenga (Diplomarbeit):

**Abbildung 7-4 Nach von apiko-basolateralen Markern in der Membran von GPMVs**

Die Isolierung der GPMVs aus MDCK II Zellen erfolgte mit der PFA-Isolationmethode, wobei die Zeiten der Isolation variiert wurden (10 - 90 min). Die GPMVs wurden eingengt und gleiche Mengen an Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Detektiert wurde gegen den apikalen Marker gp114 (A) und den basolateralen Marker E-Cadherin (B). Als Kontrolle wurde ein Zelllysat aus MDCK II Zellen mitlaufen gelassen.

5. Durchgeföhrt von Ellena Hönig (Masterarbeit):

Straube T, von Mach T, Hönig E, Greb C, Schneider D, Jacob R: **pH-Dependent Recycling of Galectin-3 at the Apical Membrane of Epithelial Cells**. Traffic (2013)

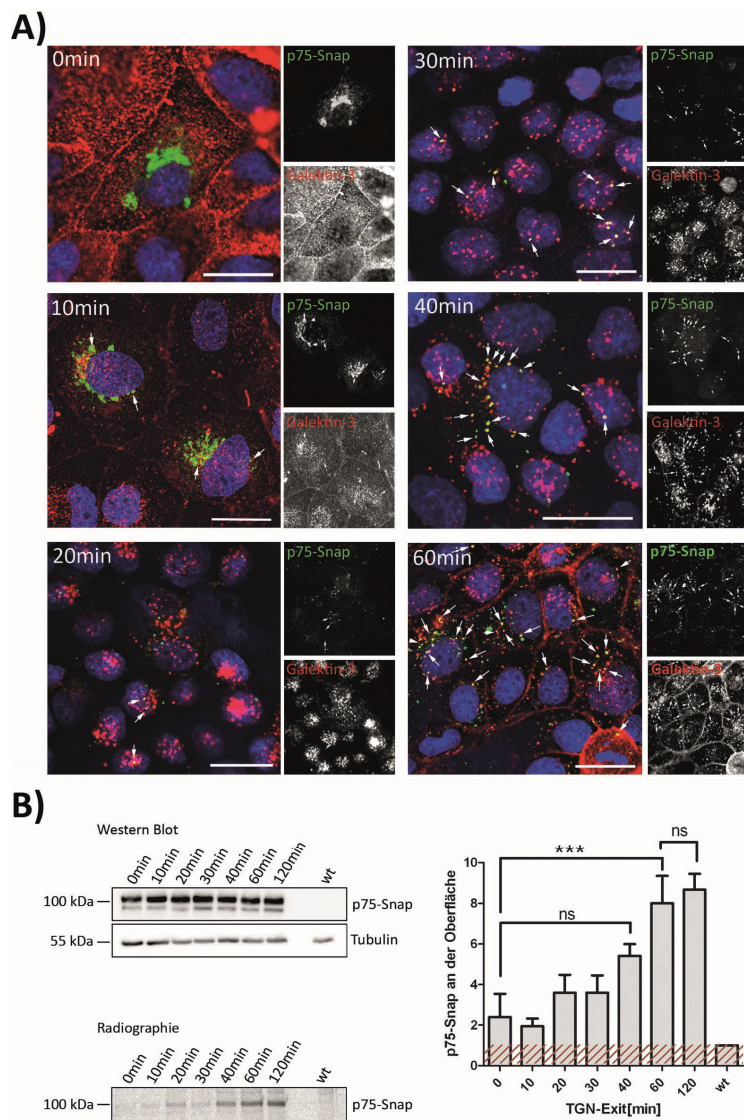


Abbildung 7-5 Kolokalisation von endozytiertem Galectin-3 mit neu synthetisiertem p75-Snap

A) Dargestellt sind vier Tage auf Deckgläschen kultivierte und transient transfizierte MDCK p75-Snap-Zellen. Die Aufnahme von Galectin-3-Alexa647 wurde gleichzeitig mit einem TGN-Exit von p75-Snap (Oregon Green) und für die angegebenen Zeitintervalle durchgeführt. Kolokalisierte Strukturen sind durch Pfeile markiert; Maßstab 25μm.

B) Transportkinetik von p75-Snap an die apikale Membran in 7 Tage auf PET-Filtern kultivierten p75-Snap-Zellen. Zu sehen ist die Western Blot-Kontrolle der p75-Snap- und Tubulinexpression in den Gesamtzelllysaten; 20μg Protein/Spur (Ra-diogramm); 50μL Oberflächen-IP-Probe/Spur. Quantifizierung der Radiographiesignale. Alle Werte wurden auf das Signal der Wildtyp-Probe (wt) normalisiert. Die rot schraffierte Fläche stellt den definierten Hintergrund dar (ns = nicht signifikant, **p<0,01, ***p<0,001), n=3.